



Revue Francophone des Laboratoires



Volume 2017, Issue 488,
Pages 3-82
January 2017

 LEMONDEDESPHARMACIENS

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](https://www.facebook.com/LEMONDEDESPHARMACIENS)

 [#LemondedesPharm](https://twitter.com/LemondedesPharm)

Elsevier Masson SAS
Société par actions simplifiées
à associé unique
au capital de 47 275 384 €
RCS Nanterre B 542 037 031
65, rue Camille-Desmoulins
92130 Issy-les-Moulineaux



Tél./Fax : 01 71 16... + les 4 chiffres
de votre correspondant
<http://www.elsevier-masson.fr>

PRÉSIDENT ET DIRECTEUR DE LA PUBLICATION :
Daniel Rodriguez

**DIRECTRICE DES REVUES PROFESSIONNELLES,
RÉDACTRICE EN CHEF :**
Yasmina Ouharzoune
y.ouharzoune@elsevier.com

CONSULTANT SCIENTIFIQUE DE LA RÉDACTION :
Claude Naudin
clinaudin@numericable.fr

COLLABORATEURS DE LA RÉDACTION :
Revue de presse :
Joël Gozlan, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès,
Vincent Maréchal, Michel Segondy
Actualités — Santé publique — Veille juridique :
Jean-Marie Manus

FAX-RÉDACTION : 01 71 16 51 59

MARKETING – RESPONSABLE DE MARCHÉ :
Sonia Tadjdet (58 60)
s.tadjdet@elsevier.com

PUBLICITÉ – RESPONSABLE DE PUBLICITÉ :
Nicolas Zarjevski (51 38)
Mobile : 06 14 68 51 26
n.zarjevski@elsevier.com

SERVICE ABONNEMENTS :

Tél. : 01 71 16 55 99 – Fax : 01 71 16 55 77
<http://www.em-consulte.com/infos>

PAO : humancom, 48 rue de Dantzig, 75015 Paris.

IMPRESSION :
Lescure Théol, 27 Douains.

Copyright© 2016 — Elsevier Masson SAS — Tous droits réservés. Cette publication et son contenu sont protégés par le copyright de Elsevier Masson SAS, et les dispositions suivantes s'appliquent à son utilisation : Les simples photocopies d'articles isolés sont autorisées pour un usage privé, dans la mesure où les lois nationales relatives au copyright le permettent. L'autorisation de l'éditeur et le paiement de redevances est obligatoire pour toutes les autres photocopies, y compris les copies multiples ou systématiques, les copies effectuées à des fins promotionnelles ou de publicité, la revente et toute autre forme de distribution de documents. Des tarifs spéciaux sont disponibles pour les institutions d'enseignement qui souhaitent faire des photocopies à des fins non commerciales d'enseignement. Les personnes peuvent obtenir les autorisations nécessaires et payer les redevances correspondantes auprès du Centre Français d'Exploitation du Droit de la Copie (20, rue des Grands-Augustins, F – 75006 Paris). Les abonnés sont autorisés à effectuer des copies des tables des matières, ou établir des listes d'articles comprenant des extraits pour un usage interne à l'intérieur de leurs institutions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour toute revente ou divulgation en dehors de l'institution. L'autorisation de l'éditeur est requise pour tous autres travaux dérivés, y compris les compilations et les traductions. L'autorisation de l'éditeur est requise pour saisir de façon électronique tout élément contenu dans la présente publication, y compris tout ou partie d'un article. Prière de prendre contact avec l'éditeur à son adresse indiquée ci-dessus. À l'exception de ce qui est indiqué ci-dessus, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite, saisie dans un système de sauvegarde, ou transmise sous quelque forme que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, sans l'autorisation préalable et écrite de l'éditeur. La responsabilité de l'éditeur ne saurait en aucune façon être engagée pour tout préjudice et/ou dommage aux personnes et aux biens, que cela résulte de la responsabilité du fait des produits, d'une négligence ou autre, ou de l'utilisation de tous produits, méthodes, instructions ou idées contenus dans la présente publication. En raison de l'évolution rapide des sciences médicales, l'éditeur recommande qu'une vérification extérieure intervienne pour les diagnostics et la posologie.

PASIEKA/SPL/PHANIE
Dépôt légal : à parution

Couverture

© Julie Bruneau

Index des annonces

Elsevier Masson

Hologic

Journées de Biologie Clinique

Ortho clinical diagnostics

7 - 22 - 30 - 38

2^e de couv

4

4^e de couv

édito

Dépakine : un drame, pas un scandale

Lors d'une séance de l'Académie de médecine consacrée aux évolutions de la prise en charge de l'épilepsie de l'adulte, le Pr Claude Huriet, membre honoris causa de l'Académie, a souhaité présenter une mise au point sur la Dépakine, évoquant l'incidence de cette molécule chez l'enfant si elle est prescrite à la femme enceinte épileptique.

Une nouvelle tempête médiatique a surgi, focalisée sur les malformations fœtales qui peuvent survenir chez l'enfant né de mère traitée par Dépakine, présentée comme un scandale, ce que dénonce le Pr Huriet.

Un scandale, dit-il, c'est la survenue d'un événement du fait de pratiques contraires à la morale, qui suscitent émotion et indignation, ce n'est pas le cas de Dépakine, et les attaques habituelles ne sont pas fondées visant laboratoires pharmaceutiques, prescripteurs, pouvoirs publics. Son argumentation...

- La gravité de l'épilepsie chez la femme enceinte tient à la survenue possible d'une mort fœtale si la maladie est insuffisamment maîtrisée.
- Dépakine est un médicament efficace, qui peut maîtriser les formes graves n'ayant pas d'alternative thérapeutique, d'ailleurs les représentants des victimes 1 n'en réclament pas l'interdiction. RFL
- C'est la responsabilité du médecin - la plus lourde qui soit, dit le Pr Huriet - d'apprécier, face à des situations individuelles, le bénéfice que l'on est en droit d'attendre de la thérapeutique, les inconvénients potentiels voire les risques du traitement.
- Quelle incrimination retenir, sauf à qualifier ce drame d'accident médical non fautif ou évoquer un défaut d'information de la patiente [quid de l'information du prescripteur par le laboratoire, le ministère et les sociétés savantes ? – NDLR].
- Comment éclairer le consentement d'une femme enceinte ayant une épilepsie sévère en lui donnant le choix entre l'arrêt d'un traitement nécessaire et l'IVG en raison du risque pour le développement fœtal, dit le Pr Huriet.

Cette réflexion n'effleure pas les médias, qui parlent d'un médicament controversé (!), ont ressorti le lynchage de l'industrie pharmaceutique ou font un parallèle hasardeux avec le scandale du Mediator.

Et si on cherchait la faille ?

RFL

[1] Association d'aide aux parents d'enfants atteints du syndrome de l'anti-convulsivant. www.apesac.org

Conseil scientifique

PRÉSIDENT : Paul LAFARGUE (Paris).

BUREAU : Bruno BAUDIN (Paris), Dominique CHABASSE (Angers), Alain CHEVAILLER (Angers), Éric GARNOTEL (Marseille), Michèle IMBERT (Créteil), Marie-Laure JOLY-GUILLOU (Angers), Marc MAYNADIÉ (Dijon), Michel SEGONDY (Montpellier).

COMITÉ :

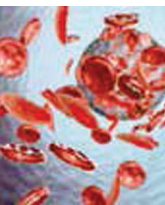
MEMBRES FRANÇAIS : Frédéric BARBUT (Paris), Patrice BOURÉE (Le Kremlin-Bicêtre), Claude GUIGUEN (Rennes), Paul HOFMAN (Nice), François JEHL (Strasbourg), Saïd KAMEL (Amiens), Marie-Nathalie KOLOPP-SARDA (Lyon), Jean-Jacques LATAILLADE (Clamart), Jean-Philippe LAVIGNE (Nîmes), Jérôme LE GOFF (Paris), Michèle MALET (Caen), Vincent MARÉCHAL (Paris), Denis MASSIGNON (Lyon), Thierry MOLINA (Paris), Valérie UGO (Angers).

MEMBRES ÉTRANGERS : Smail BELAZZOUG (Algérie), Ahcène DEMBRI (Algérie), Hicham OUAZZANI (Maroc), Lassaad SARRAI (Tunisie), Abderrahim TAZI (Maroc).

MEMBRES HONORAIRES : Marie-Hélène BESSIÈRES (Toulouse), René CHERMETTE (Maisons-Alfort), Jean-Louis KOECK (Bordeaux), Anne-Marie MANEL (Champagne-au-Mont-d'Or), Jean-Claude NICOLAS (Chatou/Princeton, USA), Martine TIROUCHE †, Michel VAUBOURDOLLE (Paris).

BRÈVES

Anémies microcytaires hypochromes héréditaires



© Dr. Katerina/fotolia.com

Les anémies microcytaires fréquentes sont souvent dues à des anomalies de synthèse de la globine. Les formes génétiques beaucoup plus rares impliquent des gènes du métabolisme du fer, du métabolisme de l'hème, de la biosynthèse des clusters fer-soufre et de la synthèse de protéines mitochondriales. Dans ces formes rares, les plus fréquentes sont les anémies sidéroblastiques *non syndromiques et les anémies de type IRIDA* (iron-refractory iron deficiency anemia). Les anémies sidéroblastiques forment un groupe hétérogène, défini par la présence de sidéroblastes en couronne dans la moelle osseuse. Les anémies de type IRIDA sont des anémies microcytaires associées à la concentration anormale d'hepcidine sérique avec une absorption anormale du fer, caractérisée par une absence de réponse au fer oral et une réponse au fer intraveineux. Les nouvelles techniques de séquençage devraient aider à identifier des gènes impliqués dans les formes rares d'anémie encore inexplicables.

Source: Hervé Puy (Centre français des porphyries, INSERM U1149). Communication à l'Académie de médecine.

Viellissement: 13 fois plus de centenaires en 2070



© Lucky Dragon/fotolia.com

Selon l'Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE), la France est le pays européen qui compte le plus de centenaires: 21 000 en 2016, soit 20 fois plus qu'en 1960-1970. Depuis 1975, les centenaires augmentent de 7 % par an, mais ne représentent que 0,03 % de la population, dont 75 % âgés de moins de 103 ans et 90 % de moins de 105 ans. Au 1^{er} janvier 2016, la doyenne française a 114 ans, elle fait partie des *supercentenaires* (âgés de plus de 110 ans), quasiment tous des femmes (84 % des centenaires sont des femmes). Parmi les centenaires, 1 sur 2 vit à domicile (hommes en majorité), 29 % habitent seuls, 3 % sont en couple, 15 % logent avec une autre personne, la plupart du temps un de leurs enfants. D'après une projection 2013-2070 de l'INSEE, en 2070, 13 % des femmes et 5 % des hommes nés en 1970 deviendraient centenaires. En 2015, seuls 1,6 % des femmes et 0,4 % des hommes nés en 1915 ont franchi la barre des 100 ans. En 2070, la France pourrait compter 270 000 centenaires, soit 13 fois plus qu'aujourd'hui. Néanmoins, ils ne représenteront que 0,4 % de la population.

Repérer les pathogènes: marquage CE pour un test français

iDTECT® Blood de la biotech française PathoQuest, émanation (*spin off*) de l'Institut Pasteur, est le premier test métagénomique basé sur le séquençage de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing/NGS*) à recevoir le marquage CE-IVD (IVD = *in vitro diagnostic*) pour la recherche et l'identification d'agents pathogènes sur échantillons de sang.

iDTECT® Blood, précise PathoQuest, élargit considérablement le spectre de détection de pathogènes. Basé sur une méthode exclusive, comparativement aux méthodes actuelles de diagnostic, il offre au clinicien d'améliorer significativement la détection de bactéries et de virus en cas de suspicion d'infection, notamment chez le patient immunodéprimé.

Pour le Dr Hélène Peyro-Saint-Paul, directeur médical de PathoQuest, « iDTECT® Blood devrait contribuer à une utilisation raisonnée des antibiotiques et au développement de la médecine de précision en infectiologie, et conduire ainsi à une meilleure prise en charge des patients ».

L'intérêt de ce type de test est souligné par le Pr Olivier Lortholary, chef du Service des maladies infectieuses et tropicales du CHU Necker-Enfants Malades (Paris). « Dans un certain nombre d'infections, en particulier chez des patients immunocompromis, les outils de diagnostic actuels, basés sur la culture et la PCR, ne permettent pas toujours la mise en œuvre d'un traitement anti-infectieux ciblé. Le test iDTECT® Blood pourrait répondre à ce besoin clinique chez ces patients dont la prise en charge est particulièrement lourde ».

Dans les LBM hospitaliers le test devrait confirmer les bons résultats d'une étude clinique au CHU Necker-Enfants Malades

et à l'Hôpital européen Georges-Pompidou (HEGP) chez 101 patients.

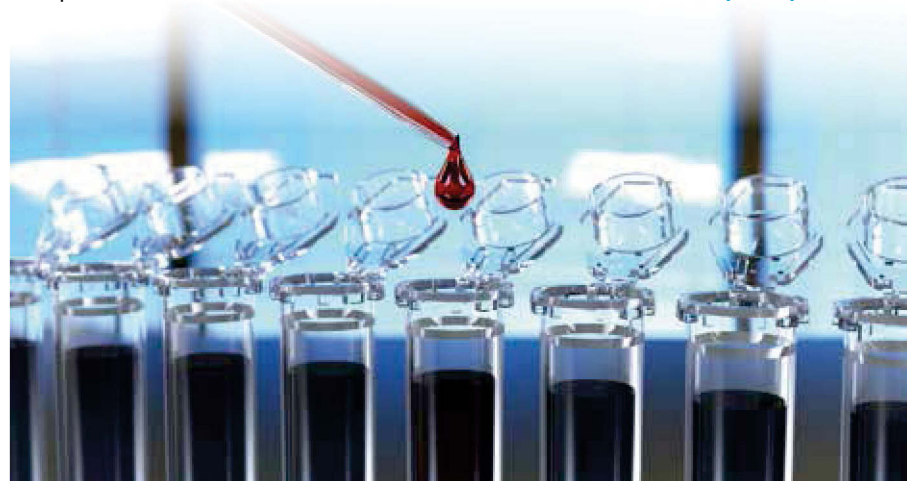
Pour Jean-François Brepson, PDG de PathoQuest, « L'obtention du marquage valide la robustesse de notre test, combinant une méthode exclusive de préparation de l'échantillon sanguin avec une analyse bio-informatique, qui s'appuie sur notre base de données et nos logiciels iDTECT. Ce résultat confirme la maîtrise de PathoQuest en métagénomique appliquée à l'infectiologie ».

La prochaine étape est la mise du test à la disposition d'hôpitaux en Europe et aux États-Unis et des partenariats stratégiques pour développer cette nouvelle solution d'identification d'agents pathogènes basée sur le NGS.

La première application commerciale proposée par PathoQuest concerne la sécurité virale, pour le contrôle qualité et la sécurité de la production de produits biologiques tels que vaccins ou protéines recombinantes. Selon PathoQuest, ce nouveau test moléculaire devrait permettre d'améliorer l'*antibio-gouvernance* (sic), via un diagnostic ultraprécis guidant le meilleur choix thérapeutique. ■■

J.-M. M

Source: PathoQuest. www.pathoquest.com



© Thomas Söllner/fotolia.com

Faire du sport malgré le cancer : un pari audacieux



DR

La Fédération nationale CAMI Sport & Cancer, soutenue par le Laboratoire Amgen, a présenté une enquête nationale résultant d'une recherche originale : quelles sont les conditions d'accès à l'activité physique et sportive en cancérologie, quels sont les principaux freins à sa pratique par les patients, si l'on considère ses avantages comme un de ces soins de support nécessairement associés à la thérapeutique, chaque fois que possible.

Enquête originale, sujet mal connu/méconnu : sport et cancer, termes apparemment inconciliables chez des patients fatigués par la maladie et le traitement, disent les auteurs. Intitulée PODIUM (Première enquête nationale sur les recommandations et les Déterminants psychosociologiques et physiques de la pratique de l'activité physique en oncologie et en hématologie), elle a concerné 1 544 patients et surtout : 894 professionnels de santé. L'enquête montre que si 3 patients sur 4 ont une activité physique malgré leur cancer, 13 % l'ont interrompue en raison de leur maladie. Pourquoi ? Réponses : au premier chef l'asthénie, fatigue prolongée (51 %), le manque de courage de pratiquer (41 %), les douleurs diverses (33 %) mais aussi les idées reçues sur l'importance du repos en cas de fatigue.

Or il en est ici en cancérologie comme ce le fut en cardiologie : prescrire le repos prolongé par prudence entraîne un déconditionnement des capacités d'effort, qui rend plus difficile la reprise d'une activité physique de nature sportive. On note cependant, selon CAMI, que la chimiothérapie, entre autres traitements oncologiques, apparaît comme le plus souvent associée à la sédentarité, probablement en raison de ses effets secondaires [dont l'asthénie], mal supportés.

Mais pour CAMI, le principal obstacle à la reprise d'une activité sportive en cas de cancer est la méconnaissance des programmes d'activité physique spécifiques, bien qu'ils soient spécialement conçus pour les sujets atteints de cancer. Car à peine 55 % des patients interrogés sur le sujet connaissent leur existence tandis que 67 % des professionnels de santé reconnaissent manquer d'information sur cette offre originale.

D'ailleurs la pratique d'une activité physique malgré le cancer résulte dans 79 % des cas d'une démarche personnelle.

En effet à peine plus de la moitié des patients ont été conseillés par un médecin hospitalier, jugé pourtant comme le plus légitime pour le faire. Il y a plus de 40 ans, les médecins ne conseillaient pas une activité physique aux cardiaques tirés d'affaire : ce sont les physiologistes scandinaves qui firent admettre la rééducation post-infarctus par exemple [NDLR].

Néanmoins, dit l'enquête, 17 % des sujets interrogés ont repris d'eux-mêmes une activité physique, après le diagnostic de cancer, convaincus des avantages de la pratique sportive.

Au cours de sa présentation CAMI a fait référence à une méthode pour retrouver le plaisir de l'effort physique, permettant aux patients traités ou en rémission, quel que soit leur âge, qu'ils soient sportifs ou sédentaires, de se réapproprier leur corps : Médiété®. Les cours sont dispensés en ville ou à l'hôpital par des éducateurs médico-sportifs formés à la méthode et aux aspects médicaux, physiques et psychologiques du cancer et aux effets des traitements, et validés par un diplôme universitaire, le DU Sport et Cancer. Il existe environ 60 centres de Médiété® dans une vingtaine de départements.

CAMI Sport & Cancer a créé le DU Sport et Cancer pour garantir la compétence des encadrants et s'appuie sur une commission d'experts et un réseau national d'éducateurs médico-sportifs titulaires de ce DU appliquant cette méthode. CAMI Sport & Cancer suggère la prise en charge de l'activité physique et sportive en cancérologie (APSC) comme thérapie du fait de son bénéfice sur la santé et... l'économie de santé. ■■

J.-M. M.

Source : CAMI et Amgen. /
Information : www.sportetcancer.com

BRÈVES

Diabète de type 2 et incidence des infections

Une équipe britannique (Julia L. Hine et coll., Université du Surrey, Guildford, Royaume Uni) a évalué l'impact de la maîtrise de la glycémie sur l'incidence des infections chez les diabétiques de type 2. Les auteurs ont analysé le taux d'infections en 2014 chez des diabétiques de type 2 comparés à des non diabétiques, à partir de registres de médecine générale. Les diabétiques étaient répartis selon leur HbA1c : bonne (< 7 %), moyenne (7-8,5 %), pauvre (> 8,5 %). À part une exception pour les HSV, le taux d'infections rapporté à l'âge était plus élevé chez les diabétiques. Les infections génitales et périnéales étaient les plus fortement associées au diabète. Une plus forte incidence a également été notée pour la bronchite, la pneumonie, infection de la peau et des tissus mous, corrélés avec une maîtrise glycémique décroissante. Comment une mauvaise maîtrise glycémique augmente l'incidence des infections : un sujet de recherche, disent les auteurs.



© Stuart Miles / Fotolia.com

source : Hine JL, et al. *Diabet Med*. 2016;doi:10.1111/dme.13205

Comment Zika abîme le crâne foetal

Une équipe de l'Université de Stanford, Californie (Joanna Wysocka et coll.) propose une explication de l'origine de la malformation du crâne des enfants nés de mères contaminées par le virus Zika : la microcéphalie, qui est une boîte crânienne de capacité si restreinte qu'elle lèse le cerveau. À partir d'études en laboratoire, les auteurs ont découvert que les cellules de la crête neurale crânienne sont vulnérables au virus Zika. Elles forment l'essentiel de l'os et du cartilage du crâne et sont en contact avec le cerveau en développement. C'est *in vitro* qu'est apparue la possibilité que Zika infecte les cellules de la crête neurale de l'embryon avec un retentissement sur le développement du cerveau, la crête se formant au premier trimestre de la grossesse. Bien que ces constatations puissent déboucher sur des recherches ultérieures il reste à confirmer la part de l'infection virale de la crête neurale chez l'Homme ou l'animal. Ou que cette infection ne suffit pas à elle seule à créer la microcéphalie. L'étude a été publiée dans *Cell Host & Microbe*.



© Giovanni Canciani / Fotolia.com

Source : communiqué de l'Université de Stanford.

PRO 140, une nouvelle monothérapie pour le VIH



© liza5450y/Fotolia.com

Les données issues d'un essai de phase 2b d'une nouvelle molécule, PRO 140 (CytoDyn), un anticorps monoclonal humanisé, suggèrent qu'elle pourrait être utilisée en monothérapie en remplacement de la trithérapie (antirétroviraux/ART) chez certains patients porteurs d'une infection à VIH.

Les investigateurs du PRO 140 (Dr Paul Maddon et coll., CytoDyn) pensent pouvoir concrétiser l'hypothèse que cette molécule utilisée seule après

une période d'ART pourrait maintenir une suppression virale prolongée chez les VIH-positifs. Les premiers patients ayant reçu le PRO 140 ont en effet été capables de maintenir cette suppression après arrêt des ART. L'essai, d'une durée de 12 semaines, regroupait 40 patients de 18 ans et plus, infectés par le VIH-1/CCR5, une souche retrouvée chez 80 à 90 % des sujets débutant un traitement. L'ACM PRO 140 a été développé pour se lier spécifiquement au récepteur CCR5, s'opposant à la contamination d'autres cellules-cibles par le VIH. Les sujets inclus dans l'essai ont interrompu leur traitement antirétroviral quotidien à la demande des investigateurs pour le remplacer par une injection sous-cutanée hebdomadaire de 350 mg de PRO 140. Certains de ces patients étaient sous ART depuis plusieurs décennies. Ceux qui maintenaient une suppression virale à 12 semaines (n = 15) ont été entraînés à l'auto-injection du PRO 140 pendant 108 semaines.

Selon les investigateurs, chez 10 de ces patients on a pu confirmer la suppression virale pendant environ 18 mois. Chez 4 autres la suppression a finalement échoué, dont 3 recevaient un traitement pour un autre problème de santé, qui aurait contribué à l'échec. Le dernier a finalement quitté l'essai avec une charge virale de 40 copies/mL. Le PRO 140 avait une bonne acceptabilité par les patients, il a été bien toléré, dépourvu d'effets indésirables sérieux, comparé aux ART.

Le développement de la molécule se poursuit en tant que monothérapie, mais l'essai de phase 3 testera aussi l'association PRO 140-ART... et une monothérapie de 2 ans au moins, sous surveillance biologique. ■■

J.-M. M.

Source: *Healio Infectious Disease*, d'après le congrès ASM Microbe, Boston, 16-20/6/2016.

Et si l'on éliminait Ebola du sperme ?

Une molécule thérapeutique expérimentale, le GS-5734, conçu par le Laboratoire Gilead Sciences pour tenter d'éliminer les virus Ebola du sperme humain après « guérison » des survivants à la MVE, est l'objet d'un essai au Libéria dans le cadre d'un partenariat entre le laboratoire américain et le ministère de la Santé de ce pays africain touché par une épidémie d'Ebola en 2014-2015.

Soutenu par le *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), l'un des instituts spécialisés des NIH qui s'est largement impliqué dans la maîtrise de l'épidémie en Afrique de l'Ouest, le GS-5734 pourrait résoudre le problème qui touche ces survivants à la MVE: « Nous savons que des traces du virus Ebola peuvent dans certains cas persister dans l'organisme d'un sujet guéri et peuvent déclencher de nouvelles poussées de la maladie chez le survivant ou être transmise à d'autres, ce qui peut constituer une nouvelle chaîne d'infection dans les communautés », explique le Dr Anthony Fauci, directeur du NIAID.

L'objectif de cet essai (PREVAIL IV) est de vérifier si la molécule expérimentale de Gilead permet d'éliminer les traces du virus Ebola chez des hommes ayant survécu à l'infection à virus Ebola. On présume que si cela est démontré, on obtiendrait une réduction de la transmission sexuelle du virus. On disposerait ainsi d'une nouvelle arme dans la pharmacopée anti-Ebola qui est en train de se constituer.

L'essai du GS-5734, qui a débuté en juillet, durera six mois. Cet essai en double aveugle [2 groupes médecins-patients ne sachant pas ce qu'on utilise] et doit impliquer de 60 à 120 patients ayant survécu à l'infection à Ebola, dont la présence d'ARN viral dans leur sperme est avérée, et ayant précédemment participé à une autre étude de traitement de l'infection dans le programme américano-libérien PREVAIL (*Partnership for Research on Ebola Virus in Liberia*).

Ces volontaires recevront soit le GS-5734, soit un placebo une fois par jour pendant cinq jours. Durant la période de six mois de suivi, ils subiront des prélèvements réguliers de sang et de sperme pour la recherche d'ARN viral dans ce dernier. Le NIH précise qu'on a conseillé à ces volontaires d'utiliser des préservatifs pendant toute la durée de l'essai...

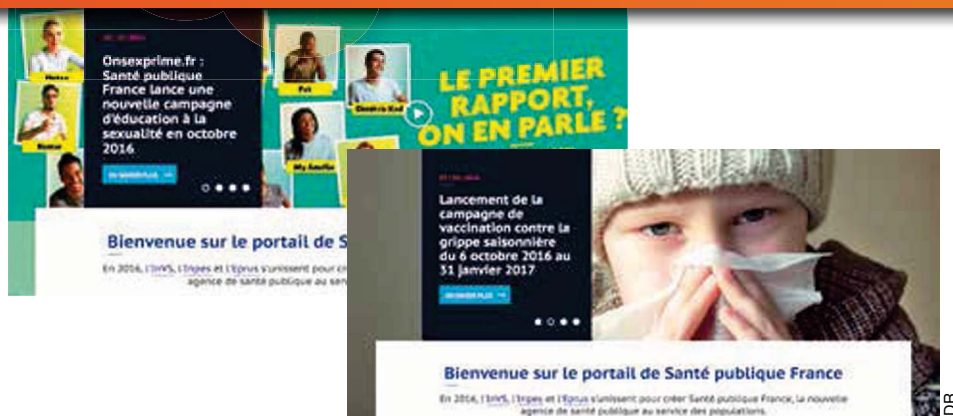


© Alexandr Mituc/Fotolia.com

Le GS-5734 n'entraîne aucun effet indésirable, comme l'a indiqué une précédente étude impliquant des hommes et des femmes, le seul effet biologique, selon les NIH, étant une élévation puis une chute des enzymes hépatiques. Dans l'essai en cours, on a prévu de surveiller les fonctions rénale et hépatique. ■■

J.-M. M.

Source: NIH, via *Healio Infectious Diseases*.
www.niaid.nih.gov
Information sur l'essai PREVAIL IV: *Clinical-Trials.gov*, identifiant NCT 02818582.



Nouveau: l'Agence nationale de santé publique

Un décret relatif à la création de l'Agence nationale de santé publique (ANSP) est paru au Journal Officiel (9/4/2016).

L'ANSP reprend les missions de l'Institut de veille sanitaire (InVS et son BEH), de l'Institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) et de l'Établissement de préparation et de réponse aux urgences sanitaires (EPRUS).

Quelles sont ses missions ?

- Diffuser des informations sur la santé des populations et les risques sanitaires, créer des systèmes de données scientifiques, sanitaires, démographiques, sociales, climatiques, environnementales, statistiques, de morbi-mortalité.
- Assurer la coordination de la surveillance, des études et de l'expertise en matière de lutte et de prévention contre les infections associées aux soins: infections nosocomiales, résistance aux antibiotiques.
- Détecter les facteurs de risques pour la santé de la population, élaborer des systèmes de surveillance/alerte de menaces sanitaires et de gestion des crises sanitaires.
- Étudier pour chaque risque l'état de santé des populations menacées, évaluer les inégalités sociales de santé, produire des indicateurs pour les politiques de santé.
- Mettre en œuvre les programmes de santé publique.
- Évaluer l'impact sur la santé des politiques publiques.
- Exercer la fonction d'expert en matière de promotion de la santé, de prévention et d'éducation pour la santé.
- Concevoir stratégies et actions de promotion de la santé, de prévention et d'éducation pour la santé, des supports d'information, des campagnes nationales de communication, etc.
- Établir des programmes de formation à l'éducation pour la santé.

- Développer les compétences en santé publique des professionnels de santé et le transfert des connaissances pour la promotion de la santé, de la prévention, et l'éducation pour la santé.
- Contribuer à la gestion des situations de crise et à la mise en œuvre des plans de réponse aux menaces, alertes et crises sanitaires, fournir des moyens à l'État.
- Procéder aux opérations de recrutement, formation, mobilisation et à l'affectation des réservistes sanitaires.
- Alerter sur les menaces sanitaires graves pour la santé, enquêter en lien avec les ARS et les Agences nationales de sécurité sanitaire.
- Alerter les autorités en cas de menace pour la population, proposer des mesures pour de santé publique.
- Organiser des auditions publiques sur des thèmes de santé publique.
- Contribuer à l'information, à la formation et à la diffusion d'une documentation scientifique et au débat public.
- Soutenir ou réaliser des formations, des études, des recherches et des évaluations en rapport avec ses missions ou participer à de telles actions;
- Participer à des actions et instances européennes et internationales, tels des réseaux internationaux de santé publique, y représenter la France.

L'ANSP peut demander à certains ministres de veiller à l'application de dispositions concernant la santé humaine. Elle s'appelle officiellement *Santé Publique France* (www.santepubliquefrance.fr). ■■

J.-M. M.

BRÈVES

Des marqueurs cutanés pour le SOMP

Hirsutisme et *acanthosis nigricans* peuvent être considérés comme des marqueurs cutanés faisant soupçonner un syndrome des ovaires micro-polykystiques (échographie transvaginale). Résultat: les femmes SOMP avaient une haute prévalence d'hirsutisme (53,3 % vs 31,2 % chez les témoins), d'*acanthosis nigricans* (36,9 % vs 20 %) et d'acné (61,2 % vs 40,4 %). Par ailleurs on notait hypertestostéronémie (40,7 % vs 4,3 %), dyslipidémie, BMI élevé, insulino-résistance. Conclusion: ces signes cutanés justifient une exploration métabolique.

Source: *Healio Internal Medicine*.

HTA de l'enfant, adulte hypertendu

Pré-hypertension (chiffres déjà élevés pour l'âge) et l'HTA chez l'enfant et l'ado sont déjà associées à des atteintes des organes-cibles et la trajectoire (sic) est déjà tracée vers une HTA du jeune adulte, selon un article paru dans *Hypertension* (un organe de l'*American Heart Association*). Abaisser la tension de 12 ans < 110/70. La cible < 120/80 (visée par l'essai SPRINT: *Systolic Blood Pressure Intervention Trial*) peut être atteinte chez les sujets de 18 ans et maintenue plusieurs décennies, au moins jusqu'à... 75 ans.

Source: *Falkner B, Gidding SS, et al. Is the SPRINT blood pressure treatment target of 120/80 mm Hg relevant for children? Hypertension*. 2016; doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06.934 on line 28/3/2016



BRÈVES



Incidence du diabète et chimie de l'environnement

Selon l'étude d'une équipe de l'Université de New York parue dans le *Journal of Epidemiology and Community Health* (Leonardo Trasande et coll.), réduire de 25 % l'exposition de l'Homme à plu-

sieurs produits chimiques domestiques courants retrouvés dans l'environnement pourrait prévenir plus de 150 000 cas de diabète de type 2 en Europe et permettre une économie de 4 milliards et demi chaque année. Les auteurs ont repris les données de plus d'un millier de Suédois de 70 à 75 ans, exposés à ces produits chimiques considérés comme des perturbateurs endocriniens, *endocrine disruptors*, des molécules perturbant les médiateurs endocriniens : phtalates, PCB, pesticides, perfluorocarbones... L'étude s'est intéressée aux taux sanguins de perturbateurs et a tenu compte de l'incidence du diabète de type 2 en Europe sur une période de 10 ans et a conclu que la réduction de 25 % de l'exposition aux *disruptors* pourrait aboutir à une économie de 150 000 diabètes ! Ce résultat se maintient en tenant compte de la consommation d'alcool, du BMI, du sexe, de l'activité physique.

Source : www.diabetes.co.uk

Autoréparation de l'ulcère du pied diabétique



Le congrès annuel de l'Association européenne pour l'étude du diabète (EASD) à Munich a entendu la présentation d'une communication décrivant le traitement de l'ulcère du pied diabétique par injection locale de cellules-souches mésenchymateuses autologues dérivées de la moelle osseuse, procédé prometteur

pour traiter l'ulcère neuropathique résistant. Présentée par Ahmed Albehairy et coll. (Université de Mansoura, Égypte), cette méthode permet une réduction supérieure de l'ulcère par rapport au traitement conventionnel à six semaines du traitement et après 12 semaines de suivi, même en présence d'ulcères plus larges chez les sujets recevant les cellules-souches. À 6 semaines du traitement, la réduction de l'ulcère était de 49,9 % chez ces derniers et de 7,67 % chez les sujets-contrôles. La guérison (progressive) est due à l'action des cellules mésenchymateuses et à leur capacité à stimuler l'angiogenèse et à réduire l'inflammation. Selon les auteurs, 10 à 15 % des ulcères du pied diabétique sont résistants aux traitements traditionnels, dont un quart peuvent obliger à l'amputation.



Une biopharma française contre le VHB chronique

Transgene (Strasbourg), biopharma qui développe des immunothérapies pour l'oncologie et l'inféctiologie, mène actuellement une étude de phase 1/1b du programme TG1050, une immunothérapie conçue en interne pour traiter l'infection chronique à virus de l'hépatite B (VHB).

Selon le Dr Maud Brandely, responsable du développement clinique et des affaires réglementaires, l'étude de phase 1/1b progresse bien sans événement indésirable grave, prochainement seront sélectionnés des patients permettant de tester des doses répétées de TG1050. « Le traitement de l'hépatite B chronique est un besoin médical non satisfait, majeur et urgent » et le TG1050 serait un traitement nettement plus efficace contre l'infection facteur de cirrhose et de cancer primitif du foie (CHC).

Cet essai clinique (NCT02428400), le premier chez l'Homme, est une étude internationale, multicentrique, randomisée en double aveugle contre placebo chez des patients porteurs chroniques du VHB, recevant déjà un traitement antiviral. L'étude de phase 1/1b doit évaluer la sécurité et la tolérance du TG1050, à différentes posologies, et la détermination de la dose efficace et du mode d'administration en vue d'études ultérieures chez les patients chroniques, qui détermineront l'activité antivirale du TG1050 et la réponse immunitaire.

TG1050 est un produit d'immunothérapie ciblée pour le traitement de l'hépatite B chronique, basé sur un vecteur viral exprimant 3 antigènes du VHB. Les résultats précliniques ont montré sa capacité à induire des réponses cellulaires T spécifiques du VHB, soutenues dans le temps,

présentant des caractéristiques similaires à celles observées chez des patients ayant éliminé l'infection.

Par ailleurs, le TG1050 fait l'objet d'un développement en Chine, via la joint-venture de Transgene avec *Tasly Biopharmaceutical Technology*, et y a obtenu le statut de nouveau médicament d'investigation (IND).

L'hépatite à virus (HVB) chronique expose à un risque élevé de cirrhose et de CHC à risque léthal. Selon des données récentes, 200 000 patients sont traités HVB chronique aux USA, en Allemagne, en France, en Italie, en Espagne et au Royaume Uni, et 100 000 au Japon. La prévalence en Chine est de 500 000 patients. Les patients des pays développés sont traités 15 ans en moyenne, souvent à vie. Il y a donc un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer le taux de guérison.

Transgene, filiale de l'Institut Mérieux, est une biopharma spécialisée en oncologie et infectiologie. Ses produits utilisent des vecteurs viraux ayant pour cibles les cellules infectées ou cancéreuses. Deux produits sont en développement : TG4010 dans le cancer bronchique non à petites cellules et Pexa-Vec dans le cancer du foie. D'autres projets en R & D sont basés sur sa technologie des vecteurs viraux. ■

J.-M. M.

Source : Transgene. www.transgene.fr

Fin de vie : le « J'Accuse » de l'ADMD

ADMD : Association pour le droit de mourir dans la dignité, président Jean-Luc Romero. Le 2 novembre, l'association a publié dans les médias un texte, accusant ceux qui n'ont rien fait, de son point de vue, pour faire avancer la cause des patients en fin de vie souhaitant l'euthanasie, sous la forme du « J'Accuse » par lequel Émile Zola prenait parti dans l'affaire Dreyfus

Pour l'ADMD, c'est d'abord le président de la République qui n'a pas respecté son « engagement de campagne, le numéro 21 », en 2012, celui de proposer à « toute personne majeure en phase avancée ou terminale [...] une assistance médicalisée pour terminer sa vie dans la dignité ».

S'adressant au Premier ministre, l'ADMD l'estime devenu « timoré » sur la fin de vie

alors qu'en 2009 il s'était dit favorable à une légalisation de l'euthanasie. Quant aux membres du gouvernement, ils n'ont produit que « des réformettes en trompe l'œil ».

Les députés sont également visés, qui auraient été nombreux à avoir oublié d'assister à une séance de l'Assemblée nationale alors qu'on y donnait la seconde lecture de la proposition de la loi Leonetti [médecin et député ayant jusqu'à maintenant produit la proposition de loi la moins contestable]. Les sénateurs ne sont pas oubliés : ils auraient, selon l'ADMD, « ignoré que plus de 90 % des Français se déclarent aujourd'hui favorables au droit à l'euthanasie ».

Le Dr Jean Leonetti (député-maire d'Antibes) est mis lui aussi en accusation, pour « avoir rédigé une loi pour les médecins, en écartant une fois de plus les patients et leurs demandes ».

« Vous les intégristes », dit l'association, s'adressant à tous ceux qui bloquent les

avancées sur la fin de vie dans la dignité... par convictions religieuses dans un pays laïc... Enfin ce « J'Accuse » vise « tous les opposants à notre droit de mourir dans la dignité », ceux qui n'ont pas encore compris, malgré les 36 ans d'activité de l'ADMD, « que nous plaçons l'Humain au cœur de notre combat ». À chaque personne ou groupe ainsi visé, l'ADMD adresse cette terrible assertion : « vous êtes coupables de laisser mourir de faim et de soif les personnes en fin de vie » ! Allusion à la suspension de l'assistance de survie en réponse à la demande d'un patient, comportant sédation profonde et arrêt de l'alimentation et de l'hydratation (3^e loi Leonetti).

Ce texte a été publié à l'occasion de la 9^e Journée mondiale pour le droit de mourir dans la dignité le 2 novembre. ■■

J.-M. M.

Source : ADMD. www.admd.net

Harcèlement à/hors l'école, problème de santé publique ?

Les conséquences du harcèlement en milieu scolaire (essentiellement collège et lycée) deviennent progressivement un problème de santé publique juvénile, en cela qu'il crée des pathologies psychologiques, s'aggravant à tel point qu'il provoque des tendances suicidaires allant jusqu'au passage à l'acte. Devant la relative inertie des établissements et des Académies vient d'être instituée une Journée nationale de mobilisation, dont la première s'est tenue le jeudi 3 novembre 2016.

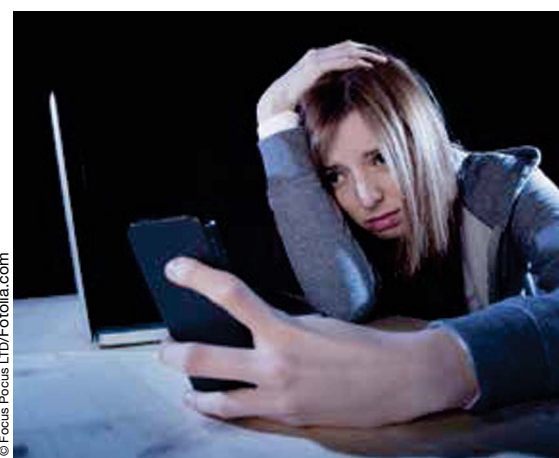
Ainsi, chaque premier jeudi de novembre sera désormais organisée une Journée nationale de mobilisation contre le harcèlement à l'école. Elle sera principalement consacrée au thème du *cyber-harcèlement*. On sait/on devrait savoir que les téléphones portables, les tablettes, les ordinateurs sont des outils largement utilisés par les harceleurs pour poursuivre leurs victimes jusque chez elles... On estime actuellement qu'un élève sur cinq est confronté à ce type de harcèlement.

Le ministère de l'Éducation nationale et l'association e-Enfance ont élaboré un guide pratique pour lutter contre le *cyber-harcèlement* entre élèves. En outre, un numéro vert national (gratuit) est spécialement dédié à ce type de harcèlement : le 0800 200 000. Ce service, anonyme et confidentiel, est ouvert du lundi au vendredi de 9 h à 19 h Pourquoi pas le samedi et le dimanche (NDLR).

Il est possible de le joindre avec Skype ou par mail (www.nonauharcèlement.education.gouv.fr), pour discuter en direct avec un conseiller ou demander à être rappelé. Ce service propose des solutions juridiques et psychologiques adaptées à la victime de cyber-harcèlement, à sa famille et au personnel éducatif.

Le site internet, oriente et donne des conseils aux utilisateurs (victime, témoin, parent ou professionnel) et propose des ressources pédagogiques (sic) à destination des professionnels et des parents.

Quant au Numéro vert 3020 Non au harcèlement (gratuit), ouvert du lundi au vendredi de 9 h à 18 h, il transmet, avec l'accord des appelants, les situations de harcèlement aux 250 référents harcèlement de



l'Éducation nationale chargés de la prise en charge de ces situations.

Rappel : le harcèlement scolaire se définit comme une violence répétée, verbale, physique ou psychologique, au sein d'un établissement scolaire ; elle est le fait d'un ou plusieurs élèves contre une victime qui ne peut se défendre. ■■

J.-M. M.

Source : Direction de l'information légale et administrative, 27/10/2016.

À consulter : www.nonauharcèlement.education.gouv.fr/wp-content/uploads/2012/01/guide_cyberharcèlement_final_webnouveau_numero.pdf

Parents cardiaques, enfants à explorer

Dans les familles comptant des sujets cardiaques, les jeunes enfants devraient bénéficier d'un dépistage précoce à la recherche de prédispositions génétiques possibles de certains types de cardiopathies, qui augmentent significativement le risque d'accident cardiaque même à un jeune âge (avant 40 ans), selon les auteurs d'une nouvelle étude britannique (Dr David Wald, cardiologie, et coll., Université Queen Mary, Londres).



Parmi les terrains à risque figure l'hypercholestérolémie familiale, la principale cause familiale de cardiopathie, soulignent les auteurs. Sans un traitement préventif (plus un traitement hygiéno-diététique), les sujets porteurs d'un terrain d'hypercholestérolémie familiale ont un risque d'infarctus du myocarde multiplié par 10 survenant avant 40 ans.

Les auteurs ont analysé les données de plus de 10 000 enfants en Angleterre (Angleterre et Pays de Galles) et ont mis en évidence qu'un sujet sur 270 était porteur du trait de l'hypercholestérolémie familiale. Ce taux est presque le double de celui auquel on se référait auparavant, c'est-à-dire un sujet sur 500, disent-ils. Une fois que l'on a identifié un tel sujet-cible de l'hypercholestérolémie familiale, les parents doivent être explorés. On constate qu'un sujet sur 125 apparaît à

haut risque d'infarctus du myocarde dans cette étude.

L'une des conclusions pertinentes de l'étude est la suivante : du fait de la disponibilité d'un traitement efficace, le dépistage de l'hypercholestérolémie familiale en même temps, par exemple, que les vaccinations de routine dès l'âge de 12 à 24 mois pourraient prévenir quelque 600 infarctus du myocarde (heart attack) chez les sujets avant 40 ans en Angleterre et au Pays de Galles.

Il s'agit de la première démonstration que le dépistage enfants-parents à grande échelle est positif, c'est la seule méthode de dépistage qui permet une couverture active en population et d'identifier les sujets à plus fort risque cardiovasculaire, résument les auteurs. À partir de là, les autorités sanitaires doivent envisager de proposer ce dépistage en routine parallè-

lement aux vaccinations des 12-24 mois, disent-ils.

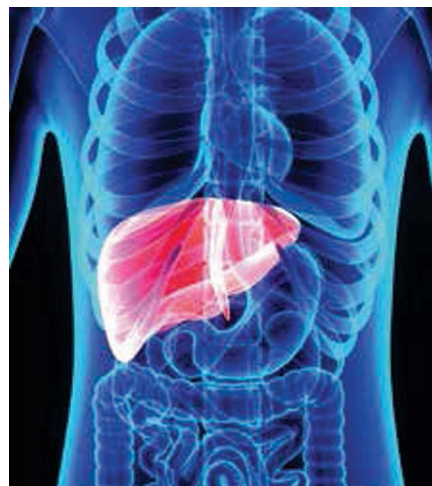
Face à un risque avéré, il peut être légitime de prescrire des statines et autres molécules chez l'adolescent (les teens : 13-18 ans) et les jeunes adultes, et de donner des conseils précoces d'hygiène de vie (traitement hygiéno-diététique, sans tabagisme). Il faut sensibiliser les parents à une vie future saine de leurs enfants... comme la leur.

Cette étude, publiée dans la *New England Journal of Medicine*, a justifié la publication d'un communiqué de presse de l'Université Queen Mary de Londres (26/10/2016) pour vulgariser ces notions sur un des sujets de santé favoris des médias. ■■

J.-M. M.

Source: *HealthDay News*

Hémochromatose ? Non, des hémochromatoses



Une séance thématique de l'Académie nationale de médecine a évoqué la **route du fer**, proposée par Catherine Buffet, membre correspondant de l'Académie, dédiée à des pathologies liées au fer, dont le métabolisme normal repose sur une autorégulation permettant d'assurer les besoins vitaux tout en évitant son accumulation tissulaire.

Les Prs Pierre Brissot et Yves Deugnier, deux des pionniers français des hémochromatoses (HC), ont détaillé le fruit de leur expérience et de leurs connaissances. Dans sa présentation, les *hémochromatoses, un monde en pleine mutation*, Pierre Brissot (Centre de référence des surcharges en fer génétiques rares, INSERM-UMR 991, Service des maladies du foie, CHU Pontchaillou, Rennes) a justifié ce pluriel.

En effet, les avancées dans la compréhension de la surcharge en fer et de son métabolisme, en biochimie, en génétique et via l'imagerie font qu'on doit désormais parler d'hémochromatoses : la nosographie des surcharges génétiques en fer englobant non seulement l'HC classique, de loin la plus fréquente, liée au gène HFE, mais aussi les HC non liées à HFE. Ces dernières comprennent le

groupe des HC juvéniles et l'HC à déficit en *ferroportine*.

Bientôt l'hepcidine ?

Le diagnostic de ces maladies peut être aujourd'hui non invasif, basé sur la clinique, l'imagerie et la génétique. Quant au traitement, s'il est encore majoritairement assuré par les saignées périodiques, il devrait, pour nombre de patients, bénéficier prochainement d'une approche pharmacologique innovante, annonce P. Brissot : la supplémentation en hepcidine, hormone hépatique permettant la maîtrise de la sidérémie.

Quant à la communication d'Yves Deugnier (Service des maladies du foie, CHU Pont-

chaillou, Rennes. membre correspondant de l'Académie de médecine) : *hyperferritinémie métabolique : une entité fréquente et anxiogène, source de conduites inadaptées*, c'était l'occasion de rappeler qu'une hyperferritinémie modérée est fréquente au cours du syndrome métabolique. Si elle excède 500 µg/L, elle témoigne en règle d'un réel excès de fer décrit sous le terme d'*hépatosidérose dysmétabolique* (HSD), qui touche essentiellement l'homme d'âge mûr.

Le diagnostic d'une HSD repose sur l'excès hépatique de fer objectivé par biopsie ou IRM, excès qui n'est pas qu'hépatique : il touche aussi la rate et le tissu viscéral

adipeux. Ce *fer adipeux* semble impliqué dans le maintien et l'aggravation de l'insulinorésistance mais la preuve n'est pas faite de l'efficacité à des saignées périodiques sur le métabolisme du glucose et de l'insuline.

Une prise en charge hygiéno-diététique vigoureuse et prolongée demeure, à ce jour, la seule mesure indiscutable dans l'HSD, conclut Y. Deugnier. ■■

J.-M. M.

NDLR - Ces deux spécialistes peuvent être contactés respectivement sur :

pierre.brissot@univ-rennes1.fr

yves.deugnier@univ-rennes1.fr

Cancer colorectal : le risque dépendrait du site de la tumeur

Selon une étude originale sur l'évolution du cancer colorectal (CCR), le pronostic serait différent selon le site de développement de la tumeur sur l'organe-cible. En résumé, le pronostic serait moins bon si la tumeur est située sur le côlon droit.

Une explication plausible est proposée par une des spécialistes américains de pathologie digestive. Les cancers du côlon gauche sont situés plus proche du sigmoïde, de l'anus et du rectum, donc du côlon descendant. Or ces cancers se caractérisent plus souvent par des saignements ou des obstructions partielles [difficultés d'exonération], et de ce fait les patients ont tendance à rechercher plus précocement un avis médical.

Et le côlon droit ? Explication : les lésions cancéreuses sur cette portion, situées sur cette première partie du gros intestin, proche de la jonction grêle/côlon ne sont généralement pas obstructives mais ont tendance à s'accompagner d'une anémie et associées à des métastases aux organes proches, principalement le foie. Elles sont généralement détectées tardivement au cours de leur progression, d'où leur moins bon pronostic par rapport à celle du côlon gauche.

Ces conclusions émanent d'une vaste étude entreprise par une équipe italienne (Dr Fausto Petrelli et coll., Treviglio) qui a repris les données de 66 publications, impliquant près d'un million et demi de



patients suivis en moyenne plus de cinq ans. Il y apparaît que les sujets porteurs d'une tumeur du côlon gauche auraient presque 20 % de risque en moins de décéder par rapport aux sujets porteurs d'une tumeur du côlon droit.

Le fait d'une possible détection plus tardive du côlon ne serait pas le seul facteur : la différence de survie entre tumeur gauche et tumeur droite tient sans doute au stade auquel le cancer est diagnostiqué, mais d'après les données histologiques, c'est surtout que tumeur gauche et tumeur droite seraient génétiquement différentes ! De ce fait, la localisation de la tumeur doit guider la définition d'un traitement.

Mais avant l'étape thérapeutique, il y a le diagnostic. Selon le site de la tumeur, l'exploration recourt soit à la sigmoïdoscopie, soit à la coloscopie, ce qui fait toute la différence, car ces techniques peuvent aussi permettre une intervention préventive/curative sur les lésions détectées à un stade précoce. L'exploration du sigmoïde

(la dernière partie du côlon) permet une exploration limitée du côlon gauche à partir du rectum jusqu'au milieu de l'abdomen (côlon transverse) alors que la coloscopie permet une exploration complète du côlon depuis la portion gauche jusqu'à la portion droite.

Pour les spécialistes américains, la coloscopie¹ reste le *gold standard*, la technique de référence pour l'exploration du côlon, basée sur ce qu'on sait à présent du pronostic dépendant de la localisation de la tumeur. ■■

J.-M. M.

Source: JAMA Oncology, 27/10/2016, communiqué de presse. David Bernstein (Hépatologie, Northwell Health, Manhasset, New York.; Jules Garbus, chirurgie colique, Winthrop-University Hospital, Mineola, New York via HealthDay News

1. Le Laboratoire Mayoly-Spindler propose Colokit®, produit de préparation du côlon en vue de son exploration.

www.mayoly-spindler.fr

BRÈVES

Ehlers-Danlos, fin d'une énigme génétique?

Les bases génétiques d'une affection difficile à diagnostiquer ont été publiées par Joshua Milner et coll. (NIH, Bethesda, Maryland, USA) : le syndrome d'Ehlers-Danlos de type III (EDS), associant hyperlaxité ligamentaire, hypermobilité articulaire, céphalées, douleurs corporelles, *flushes* cutanés, démangeaisons sévères, troubles digestifs. J. Milner et coll. ont suivi 96 sujets de 35 familles américaines ayant un EDS héréditaire, qui avaient un taux élevé de tryptase et, dans toutes les familles,

des copies surnuméraires du gène *TPSAB1*, qui code la production d'un des 2 types de tryptase, l'alphatryptase. Le nombre de copies du gène était corrélé à la sévérité des symptômes. Les auteurs ont étudié une base de données de patients et trouvé, pour chaque patient ayant un taux élevé de tryptase sérique, des copies supplémentaires de *TPSAB1* sans avoir été diagnostiqué d'un EDS ou d'une dysimmunité cellulaire. Interrogés, ils ont révélé avoir les symptômes d'un EDS. Ce constat devrait améliorer le diagnostic de l'EDS. Le futur serait un traitement anti-alphatryptase.

Nature Genetics DOI: 10.1038/ng.3696

Un Prix Galien pour l'ipilimumab

Le Laboratoire Bristol-Myers Squibb (BMS) a obtenu le Prix Galien USA (édition américaine du Prix Galien français) pour le développement d'un produit innovant d'immuno-oncologie, l'ipilimumab (Yervoy®), désigné comme la *Discovery of the Decade* (Découverte de la décennie). Cet anticorps monoclonal recombinant humanisé est approuvé dans plus de 50 pays pour le traitement du mélanome non opérable ou métastasé porteur de la mutation *BRAF V600*. L'ipilimumab se lie au *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4), qui est un régulateur négatif de l'activité des cellules T, et bloque l'interaction du CTLA-4 avec ses ligands CD80/CD86. On a montré que ce blocage augmente l'activation et la prolifération et l'activité des cellules T infiltrant la tumeur, des cellules T, soit au total une réponse immunitaire antitumorale. Le Prix Galien *Discovery of the Decade*, qui est sélectionné par un jury d'éménents scientifiques qui compte des lauréats du Prix Nobel, honore une recherche de haut niveau améliorant la condition humaine à travers le développement de traitements innovants.

Connaître/reconnaître le syndrome de Guillain-Barré

Ce syndrome a ressurgi dans l'actualité médicale avec la progression mondiale foudroyante de l'infection à virus Zika, dont c'est l'une des plus sévères complications aiguës, la constitution d'une microcéphalie et de lésions neurologiques et de retard de développement du SNC des fœtus de femmes contaminées en début de grossesse.

L'Académie nationale de médecine lui a consacré une de ses réunions du mardi, organisée par le Pr Jean-Marc Léger (Centre de référence maladies neuromusculaires rares, Paris-Est, IHU de neurosciences, CHU Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie Paris VI). Ressurgi est le mot : ce syndrome a été décrit en 1916, il associe paralysie aiguë, aréflexie tendineuse et *dissociation albumino-cytologique* du LCR. Son évolution *bénigne* a été remise en cause avec l'infection à virus Zika.

Le Dr Arnaud Fontanet (Institut Pasteur et Conservatoire national des arts et métiers, Paris) a décrit le syndrome de Guillain-Barré en tant que complication de cette infection à partir de l'épidémie en Polynésie française (2013-2014), 42 cas décrits en 6 mois, soit une augmentation par 17 de l'incidence habituelle dans cette région, observation *princeps* due à des biologistes français de Tahiti. L'incidence du SGB a été estimée à 2,4 SGB/10 000 infections à Zika. Mise en garde : cette complication neurologique grave impose une vigilance particulière, notamment une prise en charge en soins intensifs à la phase aiguë.

Quant à la thérapeutique du SGB, le Pr Jean-Marc Léger rappelle qu'elle est restée symptomatique jusqu'aux années 1980, plus de 60 ans après la description *prin-*

ceps, incluant la ventilation assistée nécessaire dans près de 25 % des cas. La prise en charge moderne optimale s'effectue en Unités de soins intensifs, étant donné la fréquence des complications, notamment dysautonomiques, et celles liées à l'immobilisation prolongée chez les patients non ambulatoires.

Les traitements immunomodulateurs, dont l'efficacité a été démontrée par des essais randomisés contrôlés, sont les échanges plasmatiques (EP) et les immunoglobulines intraveineuses (Ig) à forte dose. Les recommandations internationales préconisent 4 à 5 échanges plasmatiques ou 2 g/kg d'Ig, pratiqués de façon optimale dans les 2 premières semaines, uniquement chez les patients non ambulatoires. L'association de la méthyl-prednisolone n'apporte pas de bénéfice supplémentaire. Des questions persistent concernant notamment le traitement des formes dites bénignes (patients ambulatoires), la prise en charge des patients qui ne répondent pas aux traitements de référence et le traitement des patients présentant des rechutes après Ig. Des traitements immunomodulateurs sont à l'étude pour améliorer le pronostic, notamment chez les patients à risque d'évolution défavorable. ■■

J.-M. M.

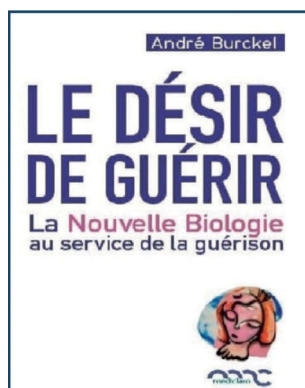


LIVRES

Le désir de guérir

La nouvelle biologie au service de la guérison

Allergies, asthme, maladies articulaires, hépatiques, pulmonaires ; dépression, anxiété, troubles du sommeil, cancers, maladies cardio-vasculaires, diabète, maladies intestinales, vieillissement... Face à la maladie, personne ne réagit de la même façon. À l'égal des performances réalisées en imagerie, la Nouvelle Biologie révolutionne l'aide au diagnostic : des analyses pour évaluer en profondeur l'état de santé : immunité, infections chroniques, inflammation, déficits, oxydation, etc. Car faire un bilan complet, dit l'auteur, c'est se donner toutes les chances sur le chemin de la guérison. Cet auteur, pharmacien, biologiste, auteur du best-seller *Les bienfaits du régime crétois*, est expert en immunologie et infectiologie, en nutrition et micronutrition,



conseiller scientifique de laboratoires de biologie médicale... et travaille depuis des années sur les dernières découvertes en biologie liées aux maladies. Il met en avant

des découvertes sur lesquelles, dit-il, aucun scientifique n'aurait misé il y a quelques années. Interpréter les analyses biologiques, cela paraît évident, il n'en est rien : pour la première fois un biologiste explique que, pour comprendre et soigner, il faut sérier les informations à travers une grille de lecture aussi précise qu'éclairante. Il développe le

principe du *profil protéique*, qui permet de tirer le *profil* du patient. ■■

André Burckel. 252 p. Éditions Mediclano. www.mediclano-editions.com

Réécrire la vie

L'auteur est PDG-fondateur de la biopharma Cellectis, spécialisée en ingénierie du génome. Docteur en virologie moléculaire, ce chercheur-entrepreneur est aussi un homme d'affaires dans un domaine où l'ambition des entrepreneurs de la vie est vouée à concevoir des produits thérapeutiques qui changent l'approche de la biologie et de la médecine, et à penser le monde des biothérapies de demain. Cellectis, biopharma française, est classée 13^e en 2016 parmi les 50 sociétés les plus innovantes au monde par la *MIT Tech Review* du *Massachusetts Institute of Technology* (MIT). Ici ce scientifique met en lumière les perspectives de l'édition des génomes et dresse un panorama des applications possibles de cette révolution du vivant, dans des domaines variés : médecine, agriculture, environne-



ment... Pour lui, l'édition du gène va bouleverser nos vies. La volonté de l'Homme de prendre les commandes de son destin

ne date pas d'hier, mais aujourd'hui se profilent des avancées extraordinaires, des progrès technologiques majeurs, qui sont en passe de lui faire gagner son pari. Connaître la formidable aventure de cette révolution permet de comprendre et d'accepter des changements hors du commun dans notre façon de vivre. Éditer le génome est au cœur de l'actualité et le concept de ciseaux à ADN ouvre la porte d'un

futur à inventer : le prologue du livre en donne une idée, grisant ! ■■

Dr André Choulika. Avec la participation de Daniel Carton. 248 p. Éditions Hugo-Doc. www.hugodoc.com

AGENDA

janvier-mai 2017

Journées de biologie clinique

16-17-18 janvier 2017

Paris/Institut Pasteur

www.jbcneckerpasteur.fr

Labquality Days 2017

9-10 février 2017

Helsinki

www.labquality.fi

Pittcon Conference/Expo

5-9 mars 2017

Atlanta

www.pittcon.org

ArabLab

20-23 mars 2017

Dubai

www.arablab.com

Microbiology Society Conference

3-6 avril 2017

Edimbourg

www.microbiologysociety.org/

ISN/World congress of nephrology

21-25 avril 2017

Mexico

www.theisn.org

European society of clinical microbiology & infectious diseases

22-25 avril 2017

Vienne (Autriche)

www.eccmid.org/eccmid_2017

Skin allergy meeting/ESCD

27-29 avril 2017

Zurich

www.eaaci.org/sam2017

ISCT 2017

International society of cell therapy

3-6 mai 2017

Londres

[@ISCTglobal](http://www.celltherapysociety.org)

ISLH/International society of laboratory hematology

4-6 mai 2017

Honolulu

www.islh.org

Paris Health Week

16-18 mai 2017

Paris/Porte de Versailles

www.pgpromotion.fr



Paludisme: marqueurs génétiques d'échec thérapeutique

Selon un article du *Lancet Infectious Diseases*, des chercheurs du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, NIH) et associés ont analysé le génome de 297 parasites du paludisme isolés de patients cambodgiens et ont identifié deux marqueurs fortement associés à la résistance à la pipéraquline.

Cette molécule prescrite en association dans le paludisme est un élément-clé du traitement. Un test réalisé sur un simple prélèvement de sang capillaire au doigt peut permettre d'identifier des parasites porteurs de ces marqueurs. S'il en est ainsi, il y a un risque d'échec thérapeutique du traitement combiné et le clinicien doit envisager une prescription alternative.

Selon les auteurs, Rick Fairhurst (NIAID) et Roberto Amato (*Wellcome Trust Sanger Institute*/WTSI) Cambridge, Royaume Uni), le traitement de première intention du paludisme associant la dihydro-artémisinine d'action rapide et la pipéraquline d'action prolongée perd de son efficacité au Cambodge avec l'émergence de parasites pipéraquline-résistants dans plusieurs provinces.

En comparant le génome des 297 parasites isolés de patients cambodgiens à un génome de référence, les auteurs ont identifié les marqueurs génétiques fortement associés à la capacité de résistance des parasites à la pipéraquline. Ils indiquent bien qu'un simple test à partir d'un prélèvement sanguin

capillaire au doigt peut indiquer si les patients sont porteurs de ces marqueurs.

Si le cas se présente, le traitement associé dihydro-artémisinine-pipéraquline est exposé à l'échec, et une alternative thérapeutique telle artésunate-méfloquine doit être pro-posée. L'extension géographique de cette résistance et de ses marqueurs est suivie par les autorités cambodgiennes et celles des pays limitrophes de façon à répertorier les zones touchées pour rectifier l'approche thérapeutique du paludisme.

Un simple test réalisé sur prélèvement sanguin capillaire indique si les patients sont porteurs de ces marqueurs.

Le premier marqueur identifié par R. Fairhurst et R. Amato et coll. est la modification d'une sous-unité d'un gène sur le chromosome 13 du parasite. Les parasites porteurs de ce changement génétique ont plus de probabilité d'être pipéraquline-résistants que les parasites non porteurs. Ce marqueur, bien qu'étant associé à cette résistance, n'a probablement pas de rôle fonctionnel

dans la résistance à la pipéraquline, selon les auteurs. Au contraire le second marqueur de résistance identifié pourrait avoir un tel rôle. Il permet d'identifier plusieurs copies de 2 gènes, *plasmepsin II* et *plasmepsin III* sur les parasites pipéraquline-résistants. Les para-sites du paludisme, indiquent les auteurs, utilisent les plasmepsines pour métaboliser le sang humain. Bien qu'on ne connaisse pas totalement le mode d'action de la pipéraquline, on pense que cette molécule cible les plasmepsines.

Ainsi les parasites pourraient réagir face à la pipéraquline en augmentant leur sécrétion de plasmepsines. De ce fait, les parasites faisant la preuve de leur résistance à la pipéraquline paraissent posséder une susceptibilité augmentée à la méfloquine. Ceci ouvre sur la possibilité de proposer des schémas thérapeutiques du paludisme associant trois molécules ou plus pour contourner la résistance. À ce travail étaient associés les chercheurs du *National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control* de Phnom Penh (Cambodge), et de la Mahidol University de Bangkok (Thaïlande). ■■

Wolfe G. et al. "Thymectomy in Non-thymomatous Myasthenia Gravis: Results from MGTX, *New England Journal of Medicine*, April XX, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1602489.

Intestin irritable, quelle prévalence ?

La prévalence du syndrome de l'intestin irritable (irritable bowel syndrome/IBS) est difficile à déterminer, notamment en raison de l'hétérogénéité des études épidémiologiques internationales. Un chercheur israélien, Ami Sperber (Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva) a engagé une revue de la littérature en contactant des experts du monde entier.

Les experts de l'IBS ont transmis leurs statistiques : de Roumanie, Japon, États Unis, Inde, Singapour, Royaume Uni, Chine, Mexique...

Les publications étudiées étaient en plusieurs langues. La prévalence par population a permis de proposer une méta-prévalence. Au total, 1451 articles ont été relus, et 83, représentant 288 103 patients dans 41 pays, correspondaient aux critères d'inclusion dans l'étude. La prévalence moyenne de l'IBS par pays est large : de 1,1 % en France et en Iran, jusqu'à 35,5 % au Mexique. Il y a une différence significative par région du monde : 17,5 % en Amérique Latine, 9,6 % en Asie, 7,1 % en Amérique du Nord, Europe, Australie et Nouvelle Zélande,

5,8 % au Moyen Orient et en Afrique. Déception : les études de prévalence par pays sont trop disparates, il serait plus intéressant qu'une prévalence globale de connaître les différences de régime alimentaire, d'exposition aux pathogènes, de pratiques de soins, de croyances religieuses et culturelles et de comprendre la physiopathologie et améliorer la prise en charge médicale. ■■

Sperber A, et al *Global IBS prevalence among adults difficult to determine. Gut.* 2016;doi:10.1136/gutjnl-2015-311240.

Varicelle USA: vers l'éradication?

En 10 ans l'incidence de la varicelle (*chickenpox*) a régressé régulièrement aux USA, selon un bilan des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC): depuis 2006 les cas ont diminué de 85 %, depuis que les médecins pratiquent une seconde dose du vaccin anti-VZV (varicelle-zona virus) chez l'enfant.

Ainsi, la plus forte baisse d'incidence de cette maladie hautement contagieuse s'observe chez les enfants de 5 à 14 ans, si l'on compare les données de 2005-2006 et de 2013-2014. C'est dans ce groupe d'âge que la baisse a été la plus forte, car c'est celui qui est le plus destiné à recevoir la seconde dose vaccinale.

Avant cette décision, la varicelle était une maladie courante, qui touchait 4 millions

d'Américains chaque année dans les années 1990, générant 13 500 hospitalisations, et entre 100 et 150 décès. Bilan actuel, selon les CDC: 3 millions et demi de cas de varicelle prévenus, 9 000 hospitalisations évitées, une centaine de décès annuels qu'on n'a pas à déplorer. La varicelle est plus sévère chez le nourrisson, l'adulte et le patient immunodéprimé. Le vaccin n'assure pas une prévention absolue, mais on remarque que lorsqu'un cas survient chez un sujet l'ayant reçu, la maladie apparaît plus modérée comparativement au sujet non vacciné, note le rapport des CDC. Par exemple, les lésions cutanées sont moindres.

À l'origine a été recommandée une seule dose vaccinale en 1996. Une nette diminution des cas fut alors observée dans les

10 années suivantes. Cependant, au gré des vagues de varicelle, les CDC décidèrent de recommander une seconde dose en 2006, la première dose étant administrée à 12-15 mois, la seconde entre 4 ans et 6 ans.

La réduction continue des cas de varicelle devrait permettre aux États d'améliorer la surveillance de la maladie tout en faisant le bilan des nouvelles recommandations de vaccination, estime l'équipe des CDC, et de comprendre pour quelle raison surviennent encore des cas sévères, notamment chez des sujets vaccinés. ■■

Adriana Lopez and coll., Morbidity and Mortality Weekly Report, US Centers for Disease Control and Prevention, 2/9/2016.

Allergie à l'arachide: un patch-traitement à la française

Viaskin® Peanut est une technologie innovante développée par la société biopharmaceutique française DBV Technologies. Tenant compte de la prévalence de l'allergie à l'arachide aux États Unis, où l'usage des produits à base d'arachide est inscrit dans les mœurs alimentaires (beurre de cacahuète), principalement chez les enfants et les adolescents, les *National Institutes of Health* (NIH) ont confié au *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), au sein d'un *Consortium for Food Allergy Research* (CoFAR, www.cofargroup.org), un essai clinique de ce dispositif médical.

Les résultats préliminaires après 1 an de suivi ont été publiés dans le *Journal of Allergy and Clinical Immunology* par Stacie M. Jones et coll.

Il s'agit d'un traitement de désensibilisation de l'allergie à l'arachide qui, bien que testé dans un essai sponsorisé par les NIH, n'est pas encore approuvé par la FDA. Ce dispositif, indiquent les auteurs, se présente comme un patch autocollant cutané, qui délivre de petites quantités de protéines d'arachide à travers la peau et qui se montre prometteur pour traiter les enfants (jusqu'à 18 ans) et les jeunes adultes allergiques à l'arachide, avec un bénéfice

particulier attendu chez les jeunes enfants, selon les résultats à 1 an déjà observés dans l'essai clinique en cours. Il s'agit d'un traitement dit *epicutaneous immunotherapy* (EPIT), immunothérapie épi-cutanée, qui s'est révélé sûr (safe) et bien toléré, et la quasi-totalité des patients l'ont utilisé quotidiennement, comme conseillé. Cet essai: *Peanut Epicutaneous Phase II Immunotherapy Clinical Trial*, enregistré sous le n° NCT01904604, est décrit sur le site <https://ClinicalTrials.gov> des NIH. L'équipe du CoFAR a organisé l'essai dans 5 centres médicaux, qui ont suivi 74 sujets allergiques à l'arachide, âgés de 4 ans à 25 ans, portant le patch actif, consommant de l'arachide soit à haute dose (250 mcg), soit une faible dose (100 mcg) et des sujets porteurs d'un patch placebo. L'allergie à l'arachide a été vérifiée au début de l'essai par une épreuve alimentaire. Les patches ont été fournis par DBV Technologies sous le nom breveté de Viaskin® (via la peau). Chaque jour les participants de l'essai appliquaient un patch sur un bras ou entre les omoplates. À 1 an, le suivi a évalué la capacité des participants à consommer au moins 10 fois d'arachide qu'avant d'entreprendre le traitement par EPIT. Les sujets consommant de fortes doses ou de faibles doses en ont tiré

quasiment le même bénéfice: chez 46 % des sujets du groupe faibles doses et 48 % du groupe fortes doses le traitement a été un succès, comparativement à 12 % des sujets du groupe patch-placebo.

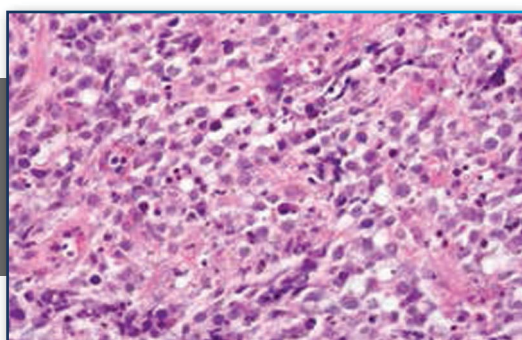
En outre, les patches arachide ont induit une réponse immunitaire similaire à celle constatée avec d'autres formes d'immunothérapie pour allergie alimentaire. Les investigateurs ont observé un effet supérieur du traitement chez les enfants de 4 ans à 11 ans par rapport aux enfants de 12 ans et plus.

Pour le NIAID, le bénéfice clinique chez le jeune enfant illustre l'approche prometteuse du traitement de l'allergie à l'arachide, l'EPIT étant conçue pour obtenir par la peau la tolérance immunitaire, plus difficile à obtenir par voie orale (15 % au maximum). Aucun effet adverse n'a été noté, uniquement des irritations ou des démangeaisons cutanées au site du patch. ■■

SM Jones et al. Epicutaneous immunotherapy for the treatment of peanut allergy in children and young adults. Journal of Allergy and Clinical Immunology DOI: 10.1016/j.jaci.2016.08.017 (2016).

Anatomie et cytologie pathologiques

Thierry Jo Molina^a



AVANT-PROPOS

Nous débutons l'année avec un numéro multidisciplinaire et pratique d'anatomie pathologique. Dans ce dossier sont traités des sujets qui intéressent aussi bien les pathologistes de ville que les hospitaliers. Ces sujets touchent à la pratique clinique de qualité par rapport notamment aux contraintes d'accréditation qui vont peser de plus en plus dans les structures de pathologie mais également à la problématique complexe des biobanques. Nous aborderons des thématiques plus médicales histopathologiques pratiques d'une part, en soulignant les principales modifications à paraître dans la future classification OMS des lymphomes, ainsi qu'une approche de démarche diagnostique classique des tumeurs pédiatriques fréquentes auxquelles tout pathologiste peut être confronté dans sa pratique généraliste ou de spécialité. Enfin, nous traiterons d'un sujet à la fois fondamental et historique appliqué à l'histopathologie, à savoir la méthodologie de visualisation des protéines, sujet en plein développement.

a Service de Pathologie

Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.
149 rue de Sèvres, 75015 Paris

* Correspondance

thierry.molina@nck.aphp.fr

Le premier article est celui de Kevine Washtine et collaborateurs qui souligne l'importance de l'enjeu de l'accréditation pour les services et cabinets de Pathologie. Aujourd'hui, l'accréditation est déjà un sujet appréhendé largement par de nombreux laboratoires de biologie alors que l'anatomie pathologique est arrivée plus tardivement dans la prise de conscience de la nécessité d'avancer dans ce domaine. Ceci est en partie lié à la culture clinique très forte des pathologistes confrontés en permanence aux cliniciens dans la prise en charge des patients, pathologistes qui se considèrent comme des cliniciens du tissu plus que comme des biologistes. D'ailleurs, une différence fondamentale par rapport à la plupart des tests biologiques est que l'accréditation en anatomie pathologique doit permettre d'obtenir des conditions optimales pour la réalisation d'un bon diagnostic histopathologique mais le diagnostic lui-même sort du champ de l'accréditation. Il n'empêche que les auteurs soulignent l'importance pour les pathologistes de s'approprier cette démarche afin de ne pas rester sur le bas-côté par rapport à la biologie, ce d'autant que de plus en plus les frontières sont poreuses entre des tests biologiques et les examens histopathologiques notamment moléculaires basés sur la détection d'acide nucléique ou de protéines. C'est tout l'intérêt de cet article de souligner à la fois les points forts et les avantages d'une part et les contraintes d'autre part, une des contraintes majeures actuelles étant l'absence de ressources suffisantes humaines et financières dans les structures pour les mettre en place de façon idoine.

Un deuxième article de l'école Niçoise traite du sujet important des biobanques, de leur coût et de leur importance dans le développement de la recherche française. Les pathologistes jouent un rôle clé dans ces biobanques et sur la validation diagnostique des biobanques notamment en priorité dans les CRB-Cancer mais également en pathologie du développement, inflammation et pathologie dégénérative. Ces biobanques tissulaires sont regroupées avec des banques cellulaires et d'acides nucléiques. Cette diversité de ces banques notamment pour un même patient peut être cruciale pour l'interprétation d'un séquençage haut débit permettant de comparer une tumeur à des cellules non tumorales. Comme cela est très clairement souligné dans l'article, ces biobanques doivent optimiser et mieux définir les prélèvements à congeler, avoir des annotations cliniques et biologiques ou histopathologiques précises afin de pouvoir valoriser ces prélèvements. Une certification deviendra impérative pour toute biobanque ayant vocation à promouvoir la recherche translationnelle et à développer des partenariats public-privé. L'importance du déstockage des tissus, de la promotion de la recherche et de la valorisation de ces collections constitueront, sans nul doute, des critères importants pour pérenniser ou non certaines d'entre elles dans un contexte économique contraint.

Le troisième article du Dr Julie Bruneau et collaborateurs a pour but de diffuser à la communauté des pathologistes les points importants de la future classification OMS des lymphomes qui va paraître début 2017 mais qui a déjà fait l'objet de tutorial dans les derniers congrès d'hématopathologie et d'une synthèse dans une revue récente internationale. L'intérêt de cette classification OMS est qu'elle est multidisciplinaire impliquant des cliniciens, pathologistes, généticiens, biologistes de différents pays dans le but de favoriser une reproductibilité diagnostique capitale d'autant plus importante à l'ère des essais cliniques internationaux de plus en plus importants. Cet article souligne notamment des changements de nomenclature allant du mot lymphome à néoplasie lymphoïde lorsque les lésions sont très minimales et du mot lymphome à lymphoprolifération lorsque l'évolution peut être indolente. Plusieurs entités pédiatriques sont revisitées ainsi que des entités définies par des anomalies génétiques ou la présence d'un virus (EBV) qui posent par exemple la problématique dans les lymphomes diffus à grandes cellules B de la détection systématique ou non des translocations chromosomiques ou de la détection du virus EBV par hybridation *in situ*. Il y a là un enjeu financier important ce d'autant que la stratégie thérapeutique est peu influencée à ce jour par ces anomalies. Cette classification nouvelle donne une grande place au séquençage pour la détection de mutations spécifiques mais l'accent

Sommaire thématique

- Les biobanques : quels enjeux en 2017 ? p. 25
- L'accréditation des laboratoires d'ACP : pourquoi est-ce incontournable ? p. 31
- Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures : ce qui va changer dans la pratique quotidienne. p. 39
- Prise en charge anatomo-pathologique des tumeurs pédiatriques p. 49
- Étude historique de la visualisation des protéines p. 59
- QCM p. 70

a été plutôt mis sur les conséquences pratiques de cette nouvelle classification pour le pathologiste. Le quatrième article du Dr Galmiche traite des tumeurs pédiatriques fréquentes non cérébrales et non hématopoïétiques. Après un rappel épidémiologique des tumeurs pédiatriques en France, l'article aborde la gestion pratique optimale au laboratoire d'un prélèvement biopsique suspect de tumeur pédiatrique et notamment la gestion préanalytique. La démarche macroscopique d'une pièce opératoire est rappelée. Surtout la démarche diagnostique devant une tumeur à cellules rondes est discutée avec la proposition d'un algorithme diagnostique immunohistochimique très utile pour le pathologiste généraliste. Enfin, trois des tumeurs les plus fréquentes sont détaillées, le neuroblastome, le néphroblastome et le rhabdomyosarcome. Le cinquième article de ce numéro est traité par le Dr Jean Frédéric Bruch et collaborateurs qui abordent l'histoire de la visualisation des protéines du XIX^e siècle jusqu'à aujourd'hui. Cet article explique pour les non spécialistes des concepts aussi complexes que la cristallographie aux rayons X, la RMN, la cryoélectromicroscopie. Des schémas didactiques ont été rajoutés ainsi que l'identification des prix Nobel ou des scientifiques fortement impliqués dans ces découvertes cruciales. Les auteurs mettent l'accent également sur la difficulté d'interprétation de certaines données qui ont été par la suite considérées comme des artefacts.

Au final ce numéro très dense est riche aussi bien sur des domaines d'organisation des structures de pathologies que dans des sujets histopathologiques classiques ou historiques fondamentaux.

Bonne lecture et surtout testez vos connaissances après la lecture sur le QCM !

La coordination de ce dossier a été assurée par le Pr Thierry Jo Molina, Service d'anatomie et cytologie pathologiques, Hôpital universitaire Necker – Enfants Malades (AP-HP), Université Paris Descartes.

Les biobanques : quels enjeux en 2017 ?

Kevin Washetine^a, Marius Ilié^{a,b,c}, Véronique Hofman^{a,b,c}, Catherine Butori^b, Elodie Long^{a,b,c}, Sandra Lassalle^{a,b,c}, Éric Selva^a, Virgine Tanga^a, Christelle Bonneteau^a, Maryline Allegra^a, Bruno Clément^d, Georges Dagher^{d,e}, Paul Hofman^{a,b,c,d,*}

RÉSUMÉ

Les biobanques ou centres de ressources biologiques (CRB) sont les maillons essentiels de la recherche translationnelle. Ces structures bénéficient de financements publics récurrents afin d'établir des collections d'échantillons biologiques utilisées dans le cadre de projets de recherche. Plus de 100 biobanques ont été développées sur le territoire national au sein des hôpitaux universitaires et des centres de lutte contre le cancer. Le développement de nouvelles techniques et de nouvelles méthodes d'analyses dans la recherche médicale bouleversent les pratiques et soulèvent de nouveaux défis scientifiques et organisationnels dans la collecte, la transformation et la conservation des échantillons. Relever ces défis devient un enjeu primordial pour les biobanques. La mise en place d'une stratégie dynamique pour anticiper les besoins des utilisateurs est nécessaire et repose sur de nouveaux modes de fonctionnement. Cet article décrit les enjeux à court et à moyen terme pour les biobanques françaises et propose des éléments d'organisation pour y répondre.

Biobanque - centre de ressources biologiques - enjeux - modèle économique, indicateurs.

1. Introduction

Le monde de la recherche évolue en permanence et crée de nouveaux défis dans tous les domaines, en particulier dans le domaine des sciences biologiques et médicales. Ainsi, la modélisation mathématique des processus biologiques, la santé « connectée », l'analyse de plus en plus complexe des « big data », les techniques d'imagerie en histologie et en radiologie de plus en plus sophistiquées,

a Biobanque (BB-0033-00025)

Hôpital Pasteur, 30 avenue de la voie romaine,
Université Nice Côte d'Azur
Nice 06001 Nice cedex,

b Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale

Hôpital Pasteur B.P. 69
30 avenue de la voie romaine
Centre Hospitalo-Universitaire de Nice
Université de Nice Sophia Antipolis

c FHU OncoAge

Centre Hospitalo-Universitaire de Nice
Université Nice Côte d'Azur, Nice

d Infrastructure Nationale Biobanque

Inserm, Paris

e Inserm, CRB-Santé et U-991

Hôpital de Pontchaillou, Rennes, France.

* Correspondance

hofman.p@chu-nice.fr

article reçu le 15 octobre 2016, accepté le 31 octobre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Biobanks: Which Challenges in 2017?

The biobanks or centers for biological resources are pivotal for translationnal research projects. These structures are granted in France by recurrent public financial supports aiming to establish collections of biological samples for research project developments. More than 100 biobanks have been set up in different public hospitals or in different comprehensive cancer centers in France. The onset of new technologies and of new methods for analyses in medical research fields induced a profound shift in routine practices and created new scientific challenges for the collect and the storage of human samples. Rising to these challenges is now a major issue for the biobanks. Setting up a dynamic strategy to anticipate the future user needs is essential and it is based on new operating modes. This review describes the short and median term challenges for the biobanks in France and proposes some ways to meet them.

Biobank - biological resource centers - business model - indicators - challenges.

la médecine personnalisée (thérapies ciblées et immunothérapie), ouvrent de multiples champs d'investigation pour les chercheurs. De plus, les outils nécessaires à l'évaluation des données issues de « l'exploitation » des ressources biologiques évoluent et font appel à des logiciels d'analyse de plus en plus élaborés. Dans ce contexte, de nombreux résultats peuvent être découverts et exploités au travers d'études *in silico* issues de ces bases de données regroupant notamment le fruit d'analyses biologiques et médicales de plus en plus complètes.

Le but de cette revue est de décrire les principaux éléments pouvant conduire une biobanque à relever avec succès les principaux enjeux du futur.

2. Les principaux « goulots d'étranglement » des biobanques/CRB en 2016

Les biobanques (ou centres de ressources biologiques/CRB) sont depuis plusieurs années des structures incontournables pour le développement de la recherche translationnelle [1]. La multiplication du nombre des biobanques à travers le monde, mais aussi la nécessité de disposer d'échantillons de très grande qualité, en nombre suffisant et rapidement disponibles a rapidement créé une compétition entre ces structures pour répondre aux besoins

des chercheurs du monde académique et industriel. Le nombre exponentiel des publications scientifiques relatives au monde des biobanques témoigne de l'intensité de cette activité dans le monde médico-scientifique [2]. La mise en place des biobanques/CRB depuis l'an 2000 en France et leur financement, soit via l'Inserm, soit via l'Institut National du Cancer (INCA) et plus récemment via la Direction Générale de l'Offre des Soins (DGOS) a permis dans chaque ville de développer des collections biologiques. Ces collections concernent des pathologies humaines tumorales ou non tumorales. Depuis cette mise en place initiale, l'évolution des biobanques s'est faite grâce par l'acquisition de grandes étapes. D'une façon générale, la première étape a reposé sur la collection d'un grand nombre d'échantillons, puis la deuxième étape a visé à améliorer la qualité de ces échantillons collectés et des données cliniques associées. Plus récemment de nouveaux objectifs sont apparus, en particulier meilleure maîtrise du modèle économique, l'intégration dans des réseaux nationaux ou internationaux thématiques et d'excellence et l'établissement de partenariats public-privé [3-7]. La pérennisation des biobanques reposera probablement sur leur reconnaissance et leur visibilité vis-à-vis du monde extérieur et des principaux leaders du monde académique et industriel.

Au-delà de la création d'une « dynamique de collecte » plusieurs écueils sont progressivement apparus au fil des années. Au sein d'une liste certainement non exhaustive, nous détaillons un certain nombre de points qui peuvent potentiellement être la cause du dysfonctionnement d'un certain nombre de ces structures ainsi établies il y a plusieurs années.

2.1. L'accumulation « non contrôlée » d'échantillons biologiques congelés

Certaines biobanques, en particulier les biobanques de tumeurs ont dans un premier temps accumulé probablement « de façon excessive » des centaines puis des milliers d'échantillons tissulaires congelés, mais sans objectif initial bien précis avec l'hypothèse que ces échantillons pourraient servir ultérieurement dans le cadre d'un projet de recherche. En fait dans pas mal de cas, cette congélation excessive a conduit à ne pas utiliser ces échantillons a posteriori et de les « thésauriser » ainsi de façon probablement indéfinie. Ceci tient à plusieurs raisons : 1) Un grand nombre de ressources biologiques accumulés n'était pas associé à des informations cliniques « d'intérêt » recueillies de façon concomitante au prélèvement biologique. La recherche rétrospective de ces informations cliniques (incluant le suivi du patient) est souvent impossible ou non « productive » (dossiers médicaux non informatisés, informations non disponibles dans le dossier, patient « perdu de vue », absence de temps humain consacré pour recueillir ces informations), 2) les données anatomopathologiques associées ne sont pas complètes ou non rapidement accessibles (stade pTNM ; type histologique), 3) la qualité/quantité requise des échantillons nécessaires selon les projets n'est pas disponible (qualité des acides nucléiques, contrôle histologique, poids de l'échantillon, concentration des acides nucléiques), 4) les formulaires de non-opposition ou de consentements

n'ont pas été signés lors de la collecte des échantillons, 5) les responsables de collections n'ont pas été identifiés initialement rendant difficile l'utilisation de certaines de ces collections, 6) La quantité et le nombre d'échantillons tissulaires congelés pour une même pathologie s'avère au final insuffisante.

2.2. L'absence de projets associés à la collecte d'échantillons biologiques

Même si l'ensemble des informations citées précédemment est présent et rapidement accessible, certaines pathologies font plus rarement à ce jour l'objet de projet de recherche et de demande d'échantillons biologiques. Par exemple l'avènement des thérapies ciblées et plus récemment de l'immunothérapie, fait que bon nombre de tumeurs congelées à faible potentiel évolutif sont moins étudiées pour la mise en évidence ou la validation de biomarqueurs pronostiques ou à visée prédictive.

2.3. L'évolution de la nature des demandes d'échantillons

La nature des demandes s'est modifiée dans le temps. Ainsi l'utilisation d'échantillons tissulaires congelés pour la validation des biomarqueurs a certainement progressivement diminué au profit d'échantillons tissulaires fixés et inclus en paraffine. En parallèle la nécessité de valider ou de découvrir certains biomarqueurs au niveau sanguin, en particulier dans le plasma, fait que les demandes associant un fragment tissulaire (congelé et/ou fixé) de la tumeur primitive et un échantillon plasmatique du même patient augmentent. La possibilité de pouvoir collectionner des échantillons tissulaires (ou sanguins) associés à chaque événement évolutif de la maladie [diagnostic initial, récurrence (s), métastase (s)] et selon le traitement administré est une opportunité nouvelle pour les biobanques, car les demandes de ce type de ressources biologiques sont à ce jour en pleine augmentation. Toutefois la mise en place de ces ressources biologiques tissulaires et liquides n'est pas toujours simple car il faut combiner les actions des pathologistes et des biologistes et idéalement stocker l'ensemble des échantillons dans un lieu commun.

2.4. Le développement de la médecine personnalisée et de l'immunothérapie

L'augmentation des thérapies ciblées sur des altérations génomiques nécessite d'intégrer les résultats de nouveaux biomarqueurs identifiables en particulier sur les tissus mais aussi dans le sang (par exemple les mutations activatrices ou de résistance de l'*EGFR*, le réarrangement de *ALK*, etc.). La recherche rétrospective de ces altérations génomiques à partir d'échantillons tissulaires et liquides stockés dans une biobanque peut prendre beaucoup de temps et être onéreuse. L'absence possible de continuum pour la gestion des échantillons (ADN déjà extrait notamment) ayant fait l'objet de telles recherches dans le cadre de l'offre de soin (notamment sur les plateformes de génétique de l'INCa) et les biobanques est un frein évident pour accéder à ces informations dans le cadre de projet de recherche. En fait seule une « requalification » de ces échantillons biologiques issus du soin à des fins de recherche permet leur utilisation dans différents projets en lien avec

des chercheurs du monde académique ou industriel. Il est de même pour des échantillons utilisés pour analyser le microenvironnement immunitaire et l'expression de certaines cibles moléculaires présentes sur les cellules tumorales dans le cadre des protocoles d'immunothérapie. Des informations associées aux échantillons biologiques sont de plus en plus complexes, notamment celles obtenues à partir d'analyses génomiques complexes (charge mutationnelle, analyse par « *next generation sequencing* », « *whole exome* »). Ces analyses génèrent des données nécessitant des compétences bioinformatiques et biostatistiques qui sont rarement présentes au sein des biobanques.

2.5. Les différentes normes relatives à la qualité et leur mise en place au sein des biobanques

Différentes normes peuvent être adoptées ou adaptées au sein d'une biobanque dans le but d'améliorer les pratiques professionnelles et ainsi donner une meilleure confiance aux utilisateurs sur le fonctionnement général de la biobanque et donc sur les échantillons transmis [8, 9]. Parmi ces normes, la norme ISO 9001 a été certainement la première à être appliquée dans les biobanques. Toutefois la norme S96-900 spécifique pour les biobanques, mise en place en France dès 2008, associe la maîtrise du management de la qualité à celle des compétences techniques dans le domaine des biobanques. En fait au début des années 2000, peu de biobanques françaises (en particulier très peu de tumorothèques) ont opté pour un « label qualité » ce qui a probablement pénalisé leur reconnaissance internationale. Le passage de la norme S96-900 à une norme internationale (ISO) dans les prochaines années devrait permettre d'augmenter encore plus la visibilité des biobanques ayant opté pour ce label. Concernant la norme ISO 15189, si un certain nombre de laboratoires de biologie en France ont commencé une démarche d'accréditation selon cette norme ou sont accrédités selon cette norme, un très faible nombre de laboratoires d'anatomopathologie est à ce jour accrédité en France selon cette norme.

Le développement de la médecine de précision requiert le contrôle de variable pré-analytique afin de garantir un diagnostic robuste et fiable. Ainsi plusieurs normes internationales ont été développées à cet effet. Elles nécessitent l'accréditation des centres et biobanques impliquées dans cette nouvelle démarche diagnostique. Ceci nécessitera une nouvelle stratégie, une nouvelle organisation du parcours de l'échantillon, un budget dédié à cette activité ainsi que du personnel compétent et une prise de conscience institutionnelle sur l'importance de s'investir dans le processus de l'accréditation.

3. Comment optimiser le fonctionnement des biobanques/CRB ?

Il est inéluctable d'optimiser le fonctionnement des biobanques, d'une part pour répondre aux nouveaux besoins des chercheurs et d'autre part pour assurer leur pérennisation. Cette optimisation passe par des actions précises dont

certaines seront décrites plus loin et par le développement d'une stratégie dynamique s'adaptant aux nouveaux objectifs des biobanques.

3.1. Contrôler et gérer la politique de congélation des tissus

Le nombre d'échantillons tissulaires congelés sollicités par un chercheur risque de décroître très vite dans un futur très proche et il est donc nécessaire d'adopter une nouvelle stratégie de collection en anticipant certains projets de recherche ou nouvelles demandes. Seules les analyses ciblant les longs ARN, notamment les longs ARN non codants, ou bien des projets de protéomique par exemple vont nécessiter obligatoirement pour l'instant l'obtention de tissus congelés. Ainsi mieux vaudra congeler des tumeurs d'intérêt compte tenu de leur rareté ou bien compte tenu d'un profil clinique particulier (par exemple les cancers pulmonaires des non-fumeurs, les cancers familiaux, etc.). En effet plusieurs raisons doivent inciter à diminuer la politique de congélation au profit de collections de blocs tissulaires inclus en paraffine : 1) de nombreuses données sont maintenant accessibles *in silico* ; 2) un nombre croissant d'analyses peut être réalisé à partir de tissus fixés et inclus en paraffine (y compris pour des projets réalisés à partir de l'extraction de certains ARN), 3) de très nombreux biomarqueurs obtenus à partir d'échantillons congelés ont maintenant fait l'objet de publications et il est inutile de reproduire ces études. Dans ce contexte les pathologistes développent des « blocothèques » spécifiquement dédiées à une activité de recherche translationnelle, indépendamment de la conservation en parallèle de blocs de paraffine conservés dans le cadre d'une activité sanitaire.

3.2. Diversifier les ressources biologiques issues des mêmes patients

Des biomarqueurs d'intérêt présents dans les tissus peuvent être identifiés dans les biofluides dont le sang ou les urines. Comme mentionné précédemment, et ce compte tenu des progrès des méthodes d'extraction des acides nucléiques et de biologie moléculaire, des marqueurs sont maintenant parfaitement identifiables à partir de tissus fixés. La possibilité d'analyser de façon concomitante une image histologique de plus grande qualité, de localiser des marqueurs protéiques dans le compartiment tumoral ou dans le microenvironnement et des altérations génomiques à partir de blocs tissulaires fixés, fait que ces ressources biologiques sont de plus en plus exploitées dans les projets de recherche. Dans ce contexte également, la possibilité de construire des « tissue microarrays » (TMAs) à partir des tissus inclus en paraffine, est une valeur ajoutée pour une biobanque, permettant aux utilisateurs d'analyser à « haut débit » sur plusieurs dizaines ou centaines de patients un biomarqueur ou plusieurs d'intérêt de façon concomitante. Compte tenu de l'émergence de certains projets, d'autres bioressources peuvent être envisagées dans une même cohorte de patients : divers biofluides (plasma, ADN libre plasmatique, cellules tumorales circulantes, liquides pleuraux, liquides céphalo-rachidiens, urines etc.) [10]. Enfin il est particulièrement utile de développer des collections biologiques issues de sujets sains, ceci permettant d'avoir à disposition des échantillons contrôlés.

3.3. Diversifier les compétences des acteurs travaillant au sein de la biobanque

Compte tenu de l'évolution des technologies et des nouvelles orientations des projets de recherche, une biobanque doit intégrer des acteurs dont les compétences professionnelles sont complémentaires. Idéalement, une biobanque travaillant comme un centre d'expertise devant répondre à des projets très spécifiques, doit donc comporter des ingénieurs biologistes (dont les compétences doivent être adaptées aux plateformes technologiques intégrées dans la biobanque), des médecins biologistes et pathologistes, des bioinformaticiens et des biostatisticiens, des « data managers », et un ingénieur qualitatif. Les nouvelles compétences à envisager dans une biobanque sont la maîtrise des programmes mathématiques ou informatiques, la gestion des « big data », l'épidémiologie.....

3.4. Établir une plateforme d'analyse associée ou intégrée dans la biobanque

Deux types de biobanques se distinguent, 1) une biobanque fonctionnant comme un lieu de stockage sécurisé et délivrant des échantillons selon les projets de recherche définis par les utilisateurs, 2) une biobanque assurant des prestations supplémentaires grâce à plusieurs plateformes technologiques intégrées [extraction d'acides nucléiques, construction « à façon » de tissu microarrays, analyse génomique, analyse anatomo-cyto-pathologique (avec possibilités de développer des analyses immunohistochimiques, d'hybridation *in situ*, de réaliser des images digitalisées, etc.)] [11, 12]. Dans ce contexte l'intégration au sein des biobanques des données complexes de la génomique, obtenues sur des plateformes de séquençage à haut débit apparaît être un enjeu majeur à moyen terme [13-15].

3.5. Intégrer des réseaux d'excellence

La possibilité de piloter des projets multicentriques ou d'y participer permet l'utilisation des échantillons biologiques, répondant notamment à des critères de qualité souvent nécessaires pour une intégration dans ces projets. Les résultats obtenus à partir de l'exploitation de ces ressources biologiques doivent permettre aussi en retour d'enrichir la base de données de la biobanque qui a délivré ces échantillons. Au final, « l'affichage » de la biobanque dans des publications de très haut niveau permet sa reconnaissance et d'augmenter sa visibilité vis-à-vis de futurs utilisateurs.

3.6. Développer des partenariats public-privé

Ces partenariats se font selon deux stratégies différentes, pouvant être complémentaires. La première stratégie est une activité de cession (à travers la budgétisation des ressources biologiques cédées, mais sans aucune plus-value scientifique). La deuxième stratégie est d'établir une collaboration scientifique dont le périmètre doit être bien défini à l'avance et au travers d'un contrat de transfert. Ce dernier cas de figure peut être aussi associé à la budgétisation des ressources biologiques sollicitées [16]. D'une façon plus générale, quelle que soit la nature des partenariats (public-privé ou public-public) le coût des échantillons devrait être systématiquement intégré dans tout projet de déstockage afin d'assurer du moins en partie

un modèle économique stable pour toute biobanque [16, 17]. L'absence d'accessibilité à ces millions d'échantillons stockés dans les biobanques pour les différents partenaires (« clients ») des secteurs public ou privé est une réalité. Il paraît ainsi urgent de trouver des solutions efficaces pour remédier à de tels dysfonctionnements [18].

3.7. Développer des projets innovants et des projets scientifiques au sein de la biobanque

Une biobanque peut optimiser sa visibilité grâce à la mise en place de projets innovants pouvant conduire à des brevets ou à des licences d'exploitation. Idéalement les membres d'une biobanque peuvent être les acteurs de projets de recherche scientifique, ce qui permet aussi d'afficher fortement leur compétence vis-à-vis d'utilisateurs potentiels.

4. Quels enjeux à court terme pour les biobanques/CRB ?

L'enjeu à court terme d'une biobanque/CRB France est de maintenir un modèle de financement stable pour fonctionner de façon efficace afin de répondre aux demandes des utilisateurs [19]. Le mode de financement établi récemment par la DGOS est basé sur un rapport d'activité reposant sur des informations déclarées par chaque institution. C'est sur ce modèle déclaratif intégrant le nombre d'échantillons collectionnés et le nombre d'échantillons utilisés, et l'existence ou non d'une certification (ISO 9001 et ou S96-900) que les biobanques perçoivent un financement récurrent mais modulable selon les chiffres déclarés annuellement. Ce mode de financement est probablement imparfait (activité déclarée mais non contrôlée sur site, absence d'intégration de la valorisation scientifique). Vu les sommes récurrentes dédiées aux biobanques françaises, il n'est pas sûr que ce type de financement perdure. Une diminution de ce financement aura pour conséquences une suppression du personnel employé en contrat à durée déterminée, voire selon le cas à un repositionnement dans une autre structure du personnel employé à durée indéterminée. De même, une réduction de ce budget peut engendrer inexorablement le non-renouvellement du matériel ou d'une maintenance préventive ou curative. Le maintien d'une certification a également un coût non négligeable et pourrait être mis en difficulté si le financement diminue. Il n'est pas impossible d'imaginer que le mode d'évaluation d'une biobanque en France puisse évoluer et intégrer assez vite d'autres indicateurs : production scientifique ou valorisation de biobanques objectivée par des publications mentionnant la biobanque, brevets, participation active à des réseaux thématiques labellisés par l'INCa (bases clinico-biologiques), objectivation des sorties des échantillons biologiques par la fourniture des « *material transfert agreement* » (MTA) signés par les parties concernées, visite d'évaluateurs ou auditeurs sur site. Une démarche d'accréditation pourrait aussi s'avérer indispensable afin de maintenir de hauts standards de qualité des biobanques françaises. Dans ce contexte, chaque biobanque française devrait dès maintenant se préparer à ces perspectives et anticiper une modification de son modèle de financement.

Par ailleurs il est important que chaque institution puisse en interne évaluer la production d'une biobanque et apprécier l'impact d'avoir ou pas une biobanque au sein de son environnement de soins et de recherche.

5. Conclusion

Les biobanques/CRB sont des outils indispensables à la réalisation de projet de recherche translationnelle, indépendamment d'autres structures hospitalières, comme les centres d'investigation clinique ou les centres de recherche clinique. Il s'agit de structure probablement « fragile » dans leur mode de fonctionnement qui repose à ce jour sur un financement ministériel, fluctuant et qui pourrait ne plus être pérenne à court terme. À l'avenir, le maintien d'une biobanque hospitalière et de son fonctionnement pourrait être uniquement lié à une décision institutionnelle jugeant de l'opportunité ou non de faire fonctionner une telle structure. Le modèle économique actuel des hôpitaux français

impose parfois des restrictions sur des plateformes et des laboratoires non indispensables à l'offre de soin et à la formation universitaire et des choix pourraient être réalisés, laissés au libre arbitre de ces institutions. Afficher une biobanque « performante », reconnue à l'échelon national et international, experte dans certains domaines et déployant un modèle économique productif aura toutes les chances d'être soutenue par une gouvernance hospitalière.

Au-delà de ces considérations, la maîtrise de la qualité des échantillons et des données associées doit être la priorité des biobanques dans le but d'assurer la robustesse des résultats scientifiques et leur reproductibilité [20-22]. Dans ce contexte une meilleure visibilité de la qualité de ces ressources issues de différentes biobanques et mises à disposition des chercheurs sera un objectif primordial à atteindre dans les années futures [23-25]

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Castillo-Pelayo T, Babinszky S, LeBlanc J, et al. The importance of biobanking in cancer research. *Biopreserv Biobank* 2015;13:172-177.
- [2] Astrin JJ, Betsou F. Trends in Biobanking: A Bibliometric Overview. *Biopreserv Biobank*. 2016;14:65-74
- [3] Baird PM, Gunter EW, Vaught J. Building a Biobank. *Biopreserv Biobank*. 2016;14:87-88.
- [4] Basik M, Aguilar-Mahecha A, Rousseau C, et al. Biopsies: next-generation biospecimens for tailoring therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10:437-450.
- [5] Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Measuring the contribution of tumor biobanks to research in oncology: surrogate indicators and bibliographic output. *Biopreserv Biobank* 2013; 11:235-244.
- [6] Hofman P, Bréchet C, Zatloukal K, Dagher G, Clément B. Public-private relationships in biobanking: a still underestimated key component of open innovation. *Virchows Arch* 2014; 464:3-9.
- [7] Watson PH. Biospecimen complexity - the next challenge for cancer research biobanks? *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 22. pii: clincanres.1406.2016
- [8] Barnes RO, Shea KE, Watson PH. The Canadian Tissue Repository Network Biobank Certification and the College of American Pathologists Biorepository Accreditation Programs: Two Strategies for Knowledge Dissemination in Biobanking. *Biopreserv Biobank*. 2016 Oct 14
- [9] Gaignaux A, Ashton G, Coppola D, et al. A Biospecimen Proficiency Testing Program for Biobank Accreditation: Four Years of Experience. *Biopreserv Biobank*. 2016 May 19.
- [10] Nejlund S, Smith J, Kraan J, et al. Cryopreservation of Circulating Tumor Cells for Enumeration and Characterization. *Biopreserv Biobank* 2016;14:330-337
- [11] Quinlan PR, Gardner S, Groves M, et al. A Data-Centric Strategy for Modern Biobanking. *Adv Exp Med Biol* 2015;864:165-169
- [12] Zhou JH, Sahin AA, Myers JN. Biobanking in genomic medicine. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139:812-818.
- [13] Bins S, Cirkel GA, Gadellaa-van Hooijdonk CG, et al. Implementation of a Multicenter Biobanking Collaboration for Next-Generation Sequencing-Based Biomarker Discovery Based on Fresh Frozen Pretreatment Tumor Tissue Biopsies. *Oncologist* 2016 Sep 23. pii: theoncologist.2016-0085
- [14] Lewis C, McQuaid S, Hamilton PW, et al. Building a 'Repository of Science': The importance of integrating biobanks within molecular pathology programmes. *Eur J Cancer* 2016; 67:191-199
- [15] Zisis K. Biobanking with Big Data: A Need for Developing "Big Data Metrics". *Biopreserv Biobank*. 2016 Jun 1
- [16] Clément B, Yuille M, Zatloukal K, et al. Public biobanks: calculation and recovery of costs. *Sci Transl Med* 2014;6:261fs45. doi: 10.1126/scitranslmed.3010444.
- [17] Matzke L, Babinszky S, Slotty A, et al. Biospecimen User Fees: Global Feedback on a Calculator Tool. *Biopreserv Biobank*. 2016 Aug 30
- [18] Scudellari M. Biobank managers bemoan underuse of collected samples. *Nat Med* 2013;19:253.
- [19] Albert M, Bartlett J, Johnston RN, et al. Biobank bootstrapping: is biobank sustainability possible through cost recovery? *Biopreserv Biobank*. 2014;12:374-380.
- [20] Baker M. How quality control could save your science. *Nature* 2016;529:456-458
- [21] Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biol* 2015;13:e1002165. doi: 10.1371/journal.pbio.
- [22] Ioannidis JP. Why Most Clinical Research Is Not Useful. *PLoS Med*. 2016 Jun 21;13:e1002049. doi: 10.1371/journal.pmed.1002049.
- [23] Kamenski PA, Sazonov AE, Fedyanin AA, et al. Biological Collections: Chasing the Ideal. *Acta Naturae*. 2016; 8:6-9
- [24] Cambon-Thomsen A, Thorisson GA, Mabile L; BRIF Workshop Group. The role of a bioresource research impact factor as an incentive to share human bioresources. *Nat Genet* 2011;43:503-504.
- [25] Mabile L, Dalgleish R, Thorisson GA, et al. Quantifying the use of bioresources for promoting their sharing in scientific research. *Gigascience* 2013;2:7
- [26] Simeon-Dubach D, Perren A. Better provenance for biobank samples. *Nature* 2011;475:454-455.

L'accréditation des laboratoires d'ACP : pourquoi est-ce incontournable ?

Kevin Washetine^{a,b,c}, Véronique Hofman^{a,b,c}, Sandra Lassalle^{a,b,c}, Elodie Long^{a,b,c}, Marius Ilié^{a,b,c}, Catherine Butori^{a,b,c}, Paul Hofman^{a,b,c,*}

RÉSUMÉ

L'activité des laboratoires d'anatomo-cyto-pathologie (ACP) s'est considérablement modifiée ces dernières années en raison de l'évolution des pratiques cliniques et des progrès thérapeutiques. Ainsi, par exemple, le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie a récemment bouleversé la prise en charge des échantillons tissulaires et cytologiques, mais aussi des échantillons sanguins à visée diagnostique, pronostique et prédictive de réponse aux nouvelles thérapies. Dans ce contexte, il est devenu essentiel d'optimiser les bonnes pratiques dans les laboratoires d'ACP, afin d'assurer une offre de soins de qualité en collaboration étroite avec les cliniciens. Si la plupart des pays industrialisés ont mis en place depuis plusieurs années un système d'accréditation dans les laboratoires d'ACP, ceci n'est pas, ou peu, le cas en France. La norme d'accréditation applicable en France pour les laboratoires d'analyse médicale est la norme ISO 15189. Cette accréditation est délivrée par un organisme, le COFRAC (comité français d'accréditation), après audit de la structure. Si cette norme est bien adaptée aux pratiques de la biologie médicale, elle est souvent discutable pour les pathologistes. Il est néanmoins incontournable de s'engager rapidement dans une démarche d'accréditation pour les laboratoires d'ACP en France afin de répondre aux nouvelles exigences de la pathologie clinique et moléculaire et notamment pour rester compétitif en Europe. Cette revue aborde les enjeux actuels et futurs de l'accréditation des laboratoires d'ACP en France mais aussi les principales contraintes et potentielles faiblesses de la norme ISO 15189 dans le cadre des activités de l'ACP.

Accréditation - anatomo-cyto-pathologie - certification - norme ISO 15189 - pathologie moléculaire.

1. Introduction

Les pratiques réalisées dans les laboratoires d'anatomo-cyto-pathologie (ACP) ont rapidement évolué ces dernières années nécessitant une adaptation du métier de pathologiste.

a Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale
Hôpital Pasteur B.P. 69 – 30 avenue de la voie romaine
06001 Nice cedex 01

Centre Hospitalo-Universitaire de Nice
Université de Nice Sophia Antipolis

b Biobanque (BB-0033-00025)
Hôpital Pasteur, Nice

c FHU OncoAge
Centre Hospitalo-Universitaire de Nice
Université Nice Côte d'Azur

Correspondance
hofman.p@chu-nice.fr

article reçu le 15 octobre 2016, accepté le 31 octobre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Accreditation of the pathology laboratories: Why it is unavoidable ?

The activity of pathology laboratories has been changed these last few years due to the evolution of clinical practices and improvement of different therapies. The onset of target therapies and immunotherapies has changed radically the management of tissue and cytological samples as well as those of the blood samples for diagnosis, prognosis and theragnosis to new molecules. In this context it is pivotal to optimize good practices in pathology laboratories in order to ensure high level of quality of care in close collaboration with the physicians. Since a couple of years, most of the industrial countries have implemented different accreditation initiatives in their pathology laboratories. However it is noteworthy that in France a very few pathology laboratories are currently accredited. The applicable standard to get an accreditation for a medical laboratory in France is the ISO 15189 norm. In France, this accreditation is issued by a notified body called the COFRAC according to the results of an audit. However if this norm is well appropriate to the practices of biology laboratories, it is more challenging for the practices of pathology laboratories. Yet it is essential for a pathology laboratory in France to be engaged in an accreditation process in order to meet the new standards of the clinical and molecular pathology and to remain competitive in Europe. The purpose of this review is to describe the main current and future challenges of the accreditation process for the pathology laboratories in France. The main constraints and potential weaknesses of the ISO 15189 norm for the accreditation of pathology laboratories will be addressed.

Accreditation - molecular pathology certification - ISO 15189 norm - pathology laboratory.

Plusieurs faits ont conduit à ces modifications :

1) les avancées de la médecine personnalisée (thérapies ciblées sur des altérations génomiques mais aussi immunothérapie) et la nécessité d'identifier rapidement ces altérations génomiques ou de nouveaux antigènes au sein des tissus, 2) le développement de nouveaux automates, mais aussi de nouveaux réactifs, permettant de répondre à la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs d'intérêt en oncologie, mais aussi dans d'autres domaines de la pathologie, comme la pathologie infectieuse, 3) l'optimisation nécessaire du circuit ou « workflow » des échantillons tissulaires et cellulaires afin d'associer les résultats de l'examen morphologique et immunohistochimique à ceux reposant

Tableau I - Principaux points forts de l'accréditation d'un laboratoire d'ACP

• Amélioration de la qualité des tests conduisant au diagnostic, au pronostic ou à la prédiction d'une réponse thérapeutique • Amélioration possible du délai de transmission des résultats aux prescripteurs • Diminution des résultats faussement négatifs ou faussement positifs • Responsabilisation des différents acteurs du laboratoire d'ACP • Motivation des équipes • Amélioration des relations entre les prescripteurs et le laboratoire d'ACP	• Meilleure compréhension du métier de pathologiste ou du fonctionnement d'un laboratoire d'ACP par les prescripteurs • Maîtrise du temps de travail • Maîtrise des coûts grâce à une meilleure gestion des consommables, des équipements et du temps de travail • Reconnaissance extérieure du laboratoire par les professionnels du secteur public et privé (dont le monde industriel) par l'affichage d'un « label qualité » • Fonctionnement à l'identique des laboratoires d'ACP des autres pays européens
--	---

sur l'analyse des différentes altérations génomiques par FISH ou après extraction de l'ADN à partir de tissus fixés et inclus en paraffine [1-6]. D'autres orientations pour la prise en charge des patients sont apparues récemment, notamment en oncologie clinique, avec pour effet quasi immédiat la nécessité pour les pathologistes d'adapter leur activité. Ces nouvelles orientations sont, 1) la mise en place des techniques de *Next Generation Sequencing* (NGS), 2) l'émergence d'une prise en charge combinée ou séquentielle des échantillons tissulaires et sanguins, avec l'utilisation des biopsies « liquides » en pratique quotidienne, 3) l'évaluation et probablement l'utilisation à court terme de marqueurs immunohistochimiques comme tests complémentaires voir comme tests « compagnons » des molécules d'immunothérapie, 4) le développement de l'imagerie digitale et de la transmission d'images [4, 7-10]. C'est dans ce contexte, qu'il paraît nécessaire de réaliser ces pratiques selon des critères de qualité maîtrisés et d'aborder une démarche active afin de rendre les résultats d'ACP et de pathologie moléculaire sous le couvert d'une accréditation. Cette revue aborde rapidement l'état des lieux sur les normes de qualité en ACP, les très grandes lignes de la norme ISO 15189, les points normatifs particulièrement utiles à l'optimisation du fonctionnement d'un laboratoire d'ACP, mais aussi les contraintes imposées par cette norme en ACP et les pistes pouvant permettre de mieux intégrer le processus d'accréditation dans les laboratoires d'ACP en France.

2. L'accréditation en ACP

L'accréditation d'un laboratoire d'ACP a pour objectif de contrôler et d'optimiser de façon continue les bonnes pratiques professionnelles en pathologie clinique et moléculaire définies selon des standards établis au niveau international [11]. L'accréditation d'un laboratoire d'ACP participe *in fine* à une meilleure reconnaissance de la qualité des examens réalisés au sein du laboratoire et à l'amélioration de l'offre de soins [12, 13]. À l'échelon international et selon les pays, il existe différentes normes d'accréditation pour les laboratoires d'ACP. Les principales normes sont la norme ISO 15189, notamment dans les pays européens, et l'accréditation délivrée par le Collège Américain des Pathologistes (CAP) [14-16]. D'une façon générale, les exigences de ces normes sont assez similaires et imposent aux laboratoires d'ACP la maîtrise du système de management de la qualité (SMQ) et celle des techniques conduisant au diagnostic et à la transmission des examens. Ainsi, l'accréditation d'un laboratoire d'ACP est de façon évidente un gage de qualité

des pratiques professionnelles déployées dans ce laboratoire, conduisant à la fiabilité du diagnostic et à donner confiance aux cliniciens et aux correspondants du laboratoire [17].

3. La norme ISO 15189 : Pourquoi une démarche d'accréditation en ACP est-elle nécessaire en 2017 ?

Dans toute profession, médicale ou non, l'assurance des normes professionnelles et de la qualité du produit final ou du service rendu sont des exigences essentielles. Cela vaut également pour la pratique des laboratoires et donc des laboratoires d'ACP [18, 19]. Dans ce contexte, les arguments devant inciter à l'accréditation d'un laboratoire d'ACP sont particulièrement convaincants (*tableau I*). Le premier objectif pour pouvoir obtenir une accréditation doit être de répondre à des exigences conduisant au respect des pratiques professionnelles afin de réaliser des examens de cytologie, d'histologie ou de pathologie moléculaire dans des conditions de qualité optimale. Conformément aux règles internationales, l'accréditation permet une reconnaissance de la compétence de la structure de pathologie fondée sur une évaluation des pratiques par les pairs. Ainsi, un examen réalisé dans un laboratoire d'ACP accrédité doit être un gage de sécurité pour la qualité du diagnostic. Un laboratoire accrédité doit pouvoir montrer à ses prestataires une plus-value dans son fonctionnement. L'obtention d'une accréditation et son maintien doivent permettre l'optimisation d'une amélioration continue de la qualité des services rendus [12, 20]. Le fait d'adopter des critères internationaux et ainsi d'harmoniser les exigences conduisant à une accréditation, fait qu'il paraît logique pour tout laboratoire d'ACP d'entrer dans une démarche d'accréditation ou de maintenir une telle accréditation. L'objectif de l'accréditation est de garantir aussi la fiabilité technique des examens de pathologie dont dépend tout naturellement la fiabilité du diagnostic [21]. L'accréditation selon la norme ISO 15189 porte globalement sur des modalités techniques et managériales de la structure d'ACP permettant l'établissement du compte rendu diagnostique mais pas sur l'évaluation du diagnostic réalisé par le pathologiste et donc ne porte pas de jugement professionnel médical. La prise en charge dans le cadre de l'offre de soin d'un échantillon cytologique ou tissulaire dépend de la répartition contrôlée des activités de la structure d'ACP et de leurs interfaces en trois processus (pré-analytique, analytique et post-analytique) dont le

découpage est laissé au libre choix de chaque structure [11]. La démarche d'accréditation permet donc de créer un véritable formalisme entre les différentes disciplines technico-médicales de laboratoire apporté par le management de la qualité dont le but principal est d'assurer une amélioration des prestations des services rendus par ces laboratoires [11]. Ce formalisme se révèle notamment au sein d'un établissement hospitalier dans lequel sont réunis les différents laboratoires d'analyses biologiques et pathologiques. Ils se réunissent selon l'organisation décidée au sein cet établissement de soin en un seul et même laboratoire représenté le plus souvent, notamment dans le système des soins en France, par un pôle de Biologie-Pathologie [11].

Le suivi de certains indicateurs doit améliorer la qualité des soins, ce qui justifiera pleinement le maintien d'une accréditation. Ainsi, la mise en place de l'accréditation peut permettre de contrôler (et donc de diminuer) le temps existant entre le prélèvement tissulaire ou cytologique (processus pré-analytique), le diagnostic (processus analytique) et la diffusion et la transmission du compte rendu au prescripteur (processus post-analytique). L'existence d'un processus de surveillance des indicateurs sur la qualité permet de surveiller et d'évaluer la performance au travers des aspects critiques des différents processus, pré-analytique, analytique et post-analytique. Le suivi des indicateurs relatifs aux points critiques techniques et des indicateurs liés aux objectifs généraux est donc essentiel. L'amélioration du secteur technique du laboratoire est aussi un point clé de l'accréditation et ceci doit entraîner une diminution du nombre des résultats faussement positifs ou faussement négatifs, en particulier en immunohistochimie et en pathologie moléculaire [11, 22, 23]. Les conséquences de ces faux résultats peuvent être en effet très néfastes pour le patient et leur réduction voire leur absence est un objectif permanent. Selon le cas, un faux résultat négatif peut entraîner une erreur de diagnostic, une mauvaise appréciation du pronostic et en cas de marqueur théranostique, l'absence d'accès pour le patient à un traitement efficace. À l'inverse, un faux résultat positif peut aussi entraîner une erreur de diagnostic, plus rarement une erreur sur l'évaluation du pronostic, et en cas de marqueur théranostique, faire administrer au patient un traitement inefficace et/ou toxique. Dans ce contexte, où le pathologiste est devenu un acteur privilégié de l'évaluation des biomarqueurs, en particulier ceux conduisant à l'administration d'une thérapie ciblée ou d'une immunothérapie, il est impératif

de réduire au maximum ce risque d'erreur [2, 4, 24]. Afin d'améliorer les bonnes pratiques professionnelles, un des points importants de la démarche d'accréditation est l'exercice obligatoire de tests d'évaluation externe de la qualité (EEQ), ce qui doit permettre à terme de limiter le nombre de résultats défectueux. L'un des points clés d'une accréditation est certainement de conduire à une bonne maîtrise des différentes étapes de la phase pré analytique dont la gestion est laissée à l'appréciation de chaque structure d'ACP. Pour un laboratoire de pathologie clinique, cette phase est définie par la période existant entre le prélèvement réalisé sur le patient et la réception et l'enregistrement de ce prélèvement au sein du laboratoire. Selon l'organisation du laboratoire et de l'établissement de soin prenant en charge le patient, la gestion de cette phase pré analytique est plus ou moins complexe. C'est probablement la phase qui impacte le plus sur la qualité des échantillons, sur la qualité des résultats et sur leurs délais de transmission, ce dernier critère étant important pour l'appréciation du bon fonctionnement d'un laboratoire d'ACP par les prescripteurs [13, 25]. Dans ce contexte, une bonne traçabilité d'un échantillon dès son prélèvement peut considérablement optimiser au final l'offre de soins aux patients [13, 25].

4. Quelles sont les contraintes et quelles sont les limites de la norme ISO 15189 pour un laboratoire d'ACP?

Si l'on doit appliquer la norme ISO 15189 certains points sont difficilement applicables aux pratiques d'un laboratoire d'ACP car peu adaptés aux processus métiers (**tableau II**). Cette norme a été initialement écrite pour les laboratoires de biologie médicale et certains aspects sont en effet difficiles/impossibles à déployer dans un laboratoire d'ACP [25]. On peut citer certains aspects relatifs à la métrologie et aux dossiers de validation des méthodes. Par exemple, des équipements utilisés dans un laboratoire d'ACP (par exemple le microtome) sont peu adaptés pour obtenir des éléments de certitude et de précision. Il est difficile de vérifier précisément l'épaisseur d'une coupe tissulaire affichée sur le microtome. De plus les dossiers de validation de méthodes et certains tests de reproductibilité, sont plus facilement réalisables à partir d'échantillons

Tableau II - Principales contraintes liées à une démarche d'accréditation d'un laboratoire de pathologie selon la norme ISO 15189

- | | | |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Entraîne potentiellement une bureaucratie excessive en cas de mauvaise maîtrise de la gestion des documents • Peut conduire à mettre en place une «sur qualité» dans les pratiques professionnelles • Différence dans le niveau d'exigence des organismes accréditeurs selon les pays pour une même norme • Différences d'exigence et d'analyse de terrain des auditeurs d'un même organisme d'accréditation | <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des coûts pour un laboratoire suite à la mise en place des processus qualité • Points normatifs particuliers de la norme peu adaptés à un laboratoire d'ACP • Rythme excessif des audits internes (et externes) pour un laboratoire déjà accrédité • Absence d'évaluation de l'expertise du pathologiste et de ses compétences selon les domaines de la pathologie concernée • Temps dédié à la qualité pouvant impacter sur le temps dédié à la pratique professionnelle | <ul style="list-style-type: none"> • Non obligation des services cliniques correspondant du laboratoire d'ACP à être accrédités/audités en parallèle de la démarche du laboratoire • L'activité de collecte d'échantillons associée à un laboratoire de pathologie et dédiée pour la recherche peut être certifiée mais n'entre pas dans le champ de l'accréditation ISO 15189 • Impact négatif sur le temps consacré à l'innovation et à la recherche biomédicale |
|---|--|---|

biologiques liquides qu'à partir d'échantillons tissulaires ou cellulaires. Répéter plusieurs dizaines de fois un test avec le même échantillon tissulaire ou cytologique peut être contraignant et conduire aussi à l'épuisement du matériel biologique. Il est aussi quasiment impossible d'avoir les mêmes « quantités de tissu » pour faire ces tests, alors que ceci est réalisable pour des volumes liquidiens. Ainsi, les incertitudes de mesure sont difficiles à établir pour les échantillons tissulaires comparativement aux échantillons liquidiens. Les incertitudes se précisent par l'évaluation d'une analyse de risque du processus de mesure, de type diagramme des 5 M (Moyens, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matière) ou de type AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité), pour maîtriser les facteurs de variabilité du processus. Cela consiste à procéder à l'analyse des facteurs susceptibles d'influencer significativement le résultat, y compris ceux dont la quantification se révèle difficile, voire impossible. Un échantillon tissulaire ou cytologique est toujours « accepté » dans un laboratoire d'ACP et ne peut pas être refusé ou jeté du fait de sa préciosité et de la nature invasive du prélèvement réalisé, comparativement à des prélèvements d'urines ou de sang que l'on peut aisément répéter. Bien qu'un prélèvement tissulaire ou cellulaire puisse être non-conforme aux exigences assignées par le prescripteur, celui est donc conservé par le laboratoire d'ACP. Les critères d'acceptation sont ainsi essentiels à définir avec les services cliniques (identification du patient, du préleveur ; du prescripteur ; date et heure du prélèvement ; conditionnement de l'échantillon et délai d'acheminement). La gestion standardisée de la phase pré analytique est peu ou non applicable en pathologie. Les règles ne peuvent pas être aussi rigoureuses que pour un échantillon destiné à la biologie médicale tel qu'un échantillon sanguin qui n'aura pas le même processus de (pré)traitement qu'un échantillon tissulaire. Par exemple, le laboratoire d'ACP s'emploie à obtenir des indications relatives à la durée d'ischémie froide et à la durée de fixation, lorsqu'elles sont jugées pertinentes. Les temps d'ischémie chaude pour une pièce opératoire ne sont à l'inverse pas maîtrisables par le laboratoire et les temps d'ischémie froide peuvent être aussi assez variables, ainsi que les durées de fixation. Tout au plus, ces temps peuvent être tracés et des écarts types peuvent être tolérés [1].

L'accréditation nécessite de consacrer du temps pour l'écriture des procédures et compte tenu de la multiplication (parfois incontrôlée) des documents rédigés ou des réunions. Il est souvent mentionné que l'accréditation entraîne une bureaucratie excessive et pénalisante pour un laboratoire, ce qui représente un frein pour beaucoup de pathologistes. En effet, le temps dédié à la mise en place d'une accréditation est pris sur le temps de travail passé par le pathologiste à se former sur son cœur de métier. Il ne faut pas que ce temps de travail réservé à la qualité impacte in fine sur la qualité du diagnostic médical. La relecture des différentes versions des procédures et des documents, de leur validation puis de leur approbation peuvent entraîner un travail très important et non anticipé, impactant au final sur le travail des techniciens, des secrétaires et des pathologistes. La mise en place d'une démarche qualité, l'obtention et le maintien d'une

accréditation impactent aussi sur le budget global du laboratoire. On peut prendre comme exemple le coût de la construction des plateaux techniques et des charges de fonctionnement inhérentes à leur activité, le nombre et le coût des contrôles de qualité intra-laboratoires ou inter-laboratoires, les évaluations externes de la qualité (EEQ), le coût des formations obligatoires pour l'ensemble du personnel, de même que les formations spécifiques à la qualité, le coût du personnel dédié à la qualité, des logiciels de management de la qualité (achat et maintenance), des vérifications/validations de méthodes (réactifs et temps de manipulations), de la maîtrise métrologique, des audits internes (réalisés par du personnel interne à l'organisme ou par un auditeur externe) et des audits externes par le COFRAC, etc. Ce budget doit être anticipé à l'avance et ne doit pas être imputé au budget établi pour le fonctionnement annuel du laboratoire. Un des non-sens majeurs de l'accréditation est que tous les laboratoires accrédités selon une même norme (par exemple la norme ISO 15189) n'ont probablement pas le même niveau de qualité en pratique quotidienne [27-29]. Ainsi, selon l'organisme qui accrédite les laboratoires en Europe, le niveau d'exigence est certainement différent. De la même façon, certaines exigences et interprétations de la norme sont assez différentes d'un auditeur à l'autre dans un même pays. D'une année sur l'autre, il est possible d'avoir des indications ou des remarques contradictoires de la part des auditeurs, d'autant plus que l'interprétation de la norme ISO 15189 et son application dans le domaine de la pathologie clinique et moléculaire sont moins bien adaptées que pour les disciplines de la biologie médicale.

Une conséquence possible pour un laboratoire d'ACP est de mettre en place une démarche non contrôlée de « sur-qualité » [30]. En effet le « faire pour faire » sans réflexion logique peut conduire à une débauche d'énergie et de moyens inutiles [30]. Le fait de rendre potentiellement obligatoire une accréditation pour continuer à fonctionner, entraîne probablement une application à la lettre des différents points de la norme « pour contenter les auditeurs » et obtenir satisfaction. Le niveau d'exigence des auditeurs peut devenir de plus en plus élevé d'une année sur l'autre et notamment lors du renouvellement de la demande d'accréditation. Ceci peut avoir un effet contre-productif pour la bonne marche du laboratoire, ce qui peut dans le temps nuire à la qualité du service rendu aux patients (temps dédié à la qualité de plus en plus important, bureaucratie excessive, coûts de plus en plus élevés, absence de priorisation des activités). Un des non-sens actuels est en fait de pouvoir accréditer un laboratoire de pathologie clinique ou un secteur de pathologie moléculaire, sans que les activités « d'amont » soient engagées dans une démarche d'accréditation ou de certification. Il peut paraître aberrant dans un système global de soins, de pouvoir obtenir une accréditation pour un laboratoire d'ACP, sans démarche parallèle d'accréditation des secteurs cliniques. L'étape pré analytique se déroulant le plus souvent en dehors du laboratoire devrait plutôt être sous le contrôle du service clinique (en lien avec le laboratoire pour établir les procédures), mais cette étape apparaît en fait sous la responsabilité du laboratoire d'ACP. Un autre exemple est de pouvoir accréditer un secteur de pathologie

moléculaire sans accréditer conjointement le secteur de pathologie clinique lui adressant les échantillons [1, 22, 23, 31]. Ceci peut paraître une faiblesse dans un processus global rendant des résultats de biologie moléculaire obtenus à partir de tissus ou de cellules.

Il est aussi discutable (bien que ce point soit très controversé par les pathologistes français en particulier) que dans le cadre de l'accréditation d'un laboratoire d'ACP, la valeur du diagnostic établi et l'expertise du lecteur ne soient pas soumises à une évaluation périodique [32, 33]. En effet autant les procédures d'habilitation sont nécessaires et obligatoires pour certains corps de métier du laboratoire d'ACP (secrétaires, techniciens), autant les pathologistes, responsables *in fine* de la qualité (fiabilité) du diagnostic, ne sont « évalués » qu'à travers leur dossier personnel, leur formation, et pas pour leurs compétences avec un audit spécifique. Si l'on demande à un clinicien non sensibilisé à la norme ISO 15189 de définir ce que l'on peut entendre par un laboratoire d'ACP accrédité, il ne serait pas impossible que sa réponse soit liée à la qualité et la fiabilité des diagnostics voire à la rapidité de transmission des résultats. Selon la norme conduisant à l'accréditation (et en particulier la norme ISO 15189), le périmètre concernant l'hygiène et la sécurité ne constitue pas un point à auditer (il devra toutefois être maîtrisé car inspecté par d'autres instances que celles en charge de la procédure d'accréditation [11]).

Même si cela semble assez logique, les EEQ ne peuvent être en principe validées que si la structure les réalisant est elle-même accréditée par la même norme. Ceci conduit à limiter le nombre de structure réalisant une EEQ reconnue par l'organisme d'accréditation. Pourtant, certains laboratoires extérieurs pourraient s'avérer être de bons interlocuteurs tant leur compétence technique est comparable à celle des structures accréditées.

L'évolution des normes est nécessaire, mais cette évolution est parfois rapide et impose une adaptation brutale des anciennes procédures mise en place et déjà accréditées. Ainsi certains items bien maîtrisés par une équipe ou par des prescripteurs disparaissent ou sont énoncés différemment d'une année sur l'autre, imposant une mauvaise compréhension des nouvelles versions. On peut prendre comme exemple la disparition de l'item imposant un manuel de prélèvement destiné aux prescripteurs cliniciens existant dans la version 2007 de la norme ISO 15189 et plus dans la version 2012 de cette norme. L'ensemble du personnel doit alors s'adapter à ces modifications. Plusieurs normes conduisant à l'accréditation d'un laboratoire d'ACP (par

exemple la norme ISO 15189 ou la norme établie par le CAP) existent donc sur le plan international. Même si les grands principes de ces normes sont globalement identiques, l'absence d'homogénéisation à travers les continents peut créer une incompréhension vis-à-vis de certains prescripteurs ou de certains « clients potentiels » et cette confusion peut conduire à la non reconnaissance du principe de l'accréditation des laboratoires d'ACP. Le terme « accréditation » est réservé à une activité orientée vers la gestion d'échantillons inclus dans un circuit d'offre de soins, ce qui exclut ainsi un audit sur certaines structures travaillant à des fins de recherche, comme les biobanques/Centre de Ressources Biologiques. Pour ces structures, il est nécessaire de certifier les collections biologiques (en particulier selon les normes ISO 9001 ou S96-900). Ce sont des organismes indépendants du COFRAC, comme l'AFNOR, qui réalisent alors les audits de certification [34]. Il paraît tout naturel cependant que des échantillons (congelés ou fixés dans le formol et inclus en paraffine) stockés dans une biobanque, mais gérés initialement dans un laboratoire d'ACP accrédité ISO 15189, puissent permettre aussi à une biobanque de bénéficier d'une démarche d'accréditation et de faire reconnaître cette biobanque comme étant une structure accréditée. L'ensemble des processus consacrés à la démarche d'accréditation (activité réservée aux soins) peut impacter un laboratoire d'ACP universitaire sur le développement de projets de recherche et d'innovation. En effet compte tenu, du temps nécessaire aux membres d'un laboratoire d'ACP pour mettre en place et maintenir une accréditation, du niveau d'exigence croissant des auditeurs, du coût de l'accréditation, des circuits des échantillons ne permettant pas souvent d'intégrer des échantillons biologiques d'origine animale, ces projets de recherche peuvent être freinés ou non réalisés.

5. Est-il possible d'adapter et d'optimiser aux pratiques de l'ACP une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189 ?

Si la nécessité d'une accréditation des laboratoires d'ACP ne fait aucun doute pour optimiser le niveau de qualité et *in fine* pour améliorer l'offre de soin aux patients, certains points pourraient permettre de rendre plus visible et plus efficace le processus d'accréditation et son application au quotidien en ACP (**tableau III**). En effet, pour un certain

Tableau III - Paramètres pouvant potentiellement améliorer la démarche d'accréditation des laboratoires de pathologie

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Mise en place d'un système d'évaluation non contraignante de la pratique professionnelle des pathologistes • Participation des services de soin à la démarche d'accréditation • Optimisation et meilleure adaptation de la norme ISO 15189 aux pratiques de l'ACP • Harmonisation des normes internationales afin d'adopter une norme unique relative à la pathologie • Reconnaître la possibilité d'accréditer une biobanque selon une norme similaire à l'ISO 15189 | <ul style="list-style-type: none"> • Secteur concernant la sécurité et l'hygiène à inclure dans les normes d'accréditation • Meilleure valorisation dans les normes d'accréditation de l'activité d'innovation et de développement au bénéfice de l'amélioration des soins • Démarche institutionnelle forte dans les hôpitaux afin d'accompagner sur le plan budgétaire la démarche d'accréditation des laboratoires d'ACP |
|---|--|

nombre de pathologistes français, il existe un écart entre toutes les exigences d'une norme, telle que l'ISO 15189 et les applications à la pratique quotidienne de leur métier. Il paraît probablement illusoire de vouloir harmoniser les différentes normes d'accréditation des laboratoires (ISO 15189, CAP, etc) en une seule norme reconnue à l'international par tous les pathologistes. Une initiative amorcée en France a récemment permis d'apporter un supplément de compréhension et d'application à la norme ISO 15189 en créant un guide technique d'accréditation en pathologie (document COFRAC SH GTA 03)[27, 32, 33].

Un point polémique portant sur l'évaluation du diagnostic formulé par les pathologistes a déjà été discuté ci dessus. Cette évaluation potentielle par des auditeurs est en effet vécue comme une remise en question des compétences acquises depuis plusieurs années. Les modalités d'une telle évaluation mériteraient probablement d'être discutées pour obtenir un consensus au sein des pathologistes sans que cela soit ressenti comme une « sanction » potentielle. On peut s'interroger sur le fait qu'un pathologiste spécialisé dans un domaine puisse brutalement prendre en charge certaines pathologies non vues depuis plusieurs années, sans une évaluation préalable. Certes les formations de « remise à niveau » sont un des moyens nécessaires pour améliorer les pratiques, mais cela ne peut pas éviter certaines incohérences lors de la prise en charge de lésions nouvelles à diagnostiquer pour ce pathologiste. Au-delà d'un audit sur la compétence, le suivi du nombre de comptes-rendus annuels réalisés par le pathologiste dans son domaine d'activité, en établissant un quota minimal pour maintenir cette activité, pourrait être un indicateur à proposer lors d'une démarche ou d'un maintien du processus d'accréditation. Déployer une analyse continue de la satisfaction des prescripteurs et indirectement des patients (par le suivi des réclamations, enquêtes de satisfaction des patients et des prescripteurs, et par le suivi des délais d'exécution de réalisation des comptes-rendus) est un moyen possible pour maintenir la qualité d'un laboratoire. On peut aussi envisager de façon « plus souple » des tests anonymes (par e-learning par exemple) délivrant régulièrement des certificats de compétence aux pathologistes d'un laboratoire accrédité. Il est certain que ce type d'évaluation devrait être progressivement proposé à minima aux jeunes pathologistes entrant dans la profession. Les points concernant la métrologie sont aussi à moduler pour un laboratoire d'ACP, ainsi que le nombre de tests à réaliser pour les contrôles intra et inter laboratoires et les EEQ. Les audits de maintien se font en principe annuellement dans le cadre de l'accréditation ISO 15189 et un laboratoire d'ACP accrédité depuis plusieurs années pourrait au mieux voir espacer ces audits de suivi et de maintien.

L'objectif à long terme est de rendre le plus efficace possible le maintien d'un système de management de la qualité et des compétences techniques. Il est donc important de s'approprier des règles émises légalement et normativement ainsi que par le système mis en place au sein du laboratoire pour ensuite faire part de son expérience et en discuter pour une organisation et un fonctionnement efficient.

6. Conclusion

Tous les laboratoires ne sont pas accrédités pour transmettre des résultats, notamment dans certains pays comme la France [35]. On peut donc se demander si l'accréditation donne une plus-value concrète à un laboratoire dans sa pratique quotidienne et dans sa visibilité vis-à-vis du monde extérieur et des correspondants. Les laboratoires d'ACP accrédités répondent à des exigences communes synonymes de gage de qualité pour la prise en charge des échantillons tissulaires ou cytologiques conduisant au diagnostic. Si les normes d'accréditation (en particulier la norme ISO 15189) ne sont pas parfaitement adaptées à la pratique de la pathologie clinique et de la pathologie moléculaire, elles permettent d'établir des standards internationaux et d'homogénéiser les pratiques professionnelles entre les pays, notamment sur le plan du système de management de la qualité et des exigences techniques. La démarche d'accréditation a fait perdre plus ou moins partiellement aux pathologistes leur indépendance par les fusions qu'elle a suscitées avec les autres disciplines et par les contrôles réalisés par des organismes externes. Cependant la reconnaissance externe conférée par l'accréditation permet aussi aux pathologistes de s'engager vers une meilleure visibilité en termes de compétences technico-médicale et vers la modernisation rapide des pratiques. Sur le plan économique, certains pays (comme la Belgique) n'ont pas hésité à relier le remboursement des actes de pathologie clinique et de biologie moléculaire à l'accréditation.

Finalement on peut aussi souligner que certains points normatifs, s'ils ne sont pas respectés « à la lettre », n'empêchent certainement pas un laboratoire d'ACP de rendre des résultats fiables et de grande qualité. Ainsi, une certaine flexibilité des auditeurs dans ce processus d'obtention et de maintien de l'accréditation devrait être nécessaire afin de mieux évaluer les bonnes pratiques professionnelles d'un laboratoire d'ACP.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, et al. Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques. *Ann Pathol* 2010; 30:85-93.
- [2] Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Immunohistochemistry and personalized medicine in lung oncology: advantages and limitations. *Bull Cancer*. 2014;101:958-965.
- [3] Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Issues and current limits for immunohistochemical assessment of PD-L1 status in bronchial biopsies. *Bull Cancer* 2016;103:368-380

- [4] Ilie M, Hofman V, Dietel M, et al. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Arch*. 2016;468:511-525.
- [5] Millner LM, Strotman LN. The future of precision medicine in oncology. *Clin Lab Med*. 2016;36:557-573.
- [6] Yuan J, Hegde PS, Clynes R, et al. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy *J Immunother Cancer*. 2016; 4: 3. Published online 2016 Jan 19. doi: 10.1186/s40425-016-0107-3

- [7] Aziz N, Zhao Q, Bry L, et al. College of american pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. Arch Pathol Lab Med 2015; 139:481-493.
- [8] Endrullat C, Glöckler J, Franke P, Frohme M. Standardization and quality management in next-generation sequencing. Appl Transl Genom. 2016 Jul 1;10:2-9.
- [9] Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies : to be or not to be? Virchows Arch. 2016 Aug 23.
- [10] Ilie M, Long E, Hofman V et al. Les méthodes de séquençage de «nouvelle génération» (NGS) et le cancer broncho-pulmonaire: principales technologies, applications et limites actuelles en pathologie. Rev Fr Lab 2014; 458: 51-58.
- [11] Washetine K, Long E, Hofman V, et al. The accreditation of a surgical pathology and somatic genetic laboratory (LPCE, CHU of Nice) according to the ISO 15189 norm: Sharing of experience. Ann Pathol 2013; 33:386-397.
- [12] Peter TF, Rotz PD, Blair DH, et al. Impact of laboratory accreditation on patient care and the health system. Am J Clin Pathol 2010; 134:550-555.
- [13] Schuerch C, Selna M, Jones J. Laboratory clinical effectiveness: pathologists improving clinical outcomes. Clin Lab Med 2008; 28:223-244.
- [14] Abu-Amro KK. Overview of the laboratory accreditation programme of the College of American Pathologists. East Mediterr Health J 2002; 8:654-663.
- [15] Bachner P, Howanitz PJ, Lent RW. Quality improvement practices in clinical and anatomic pathology services. A College of American Pathologists Q-probes study of the program characteristics and performance in 580 institutions. Am J Clin Pathol 1994; 102:567-571.
- [16] Gough LA, Reynolds TM. Is clinical pathology accreditation worth it? A survey of CPA-accredited laboratories. Clin Perform Qual Health Care 2000; 8:195-201.
- [17] Allen LC. Role of a quality management system in improving patient safety - laboratory aspects. Clin Biochem 2013; 46:1187-1193.
- [18] Burnett D, Blair C, Haeney MR, et al. Clinical pathology accreditation: standards for the medical laboratory. J Clin Pathol 2002; 55:729-733.
- [19] Burnett D. ISO standards for pathology - a step too far? Ann Clin Biochem. 2015;52 (Pt 6):712-714.
- [20] Solis-Rouzan P. Experience of Implementing ISO 15189 Accreditation at a University Laboratory. EJIFCC. 2015; 26:270-273
- [21] Clark D. Quality improvement in basic histotechnology: the lean approach. Virchows Arch 2016; 468:5-17.
- [22] Long E, Hofman V, Ilie M, et al. Accreditation of the activity of molecular pathology according to ISO 15189: key steps to follow and the main potential pitfalls. Ann Pathol 2013; 33:12-23.
- [23] Long E, Hofman V, Ilie M, et al. Setting up a department of molecular pathology in oncology in a pathology laboratory (LPCE, CHU de Nice). Ann Pathol 2013; 33:24-37.
- [24] Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry--experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiqC). Virchows Arch 2016;468:19-29
- [25] Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, et al. Quality indicators to detect pre-analytical errors in laboratory testing. Clin Chim Acta. 2014; 432:442-448
- [26] Huisman W. European medical laboratory accreditation. Present situation and steps to harmonisation. Clin Chem Lab Med 2012; 50:1147-1152.
- [27] www.cofrac.fr. Cofrac, Comité Français d'Accréditation.
- [28] www.european-accreditation.org. EA, European coopération for Accreditation.
- [29] www.ilac.org. ILAC, International Laboratory Accreditation Cooperation.
- [30] Bosman FT, Lehr HA. Quality in pathology : how good is good ? An introduction. Virchows Arch 2016; 468:1-4.
- [31] Tembuysen L, Dequeker EM. Endorsing good quality assurance practices in molecular pathology: risks and recommendations for diagnostic laboratories and external quality assessment providers. Virchows Arch 2016; 468:31-41.
- [32] Bailey D. Ensuring quality in postgraduate medical education: competency testing is the key. Virchows Arch 2016; 468:115-119.
- [33] van der Valk P. Quality assurance in postgraduate pathology training the Dutch way : regular assessment, monitoring of training programs but no end of training examination. Virchows Arch 2016; 468:109-113.
- [34] www.afnor.fr. Afnor. Association française de normalisation.
- [35] Boursier G, Vukasovic I, Brguljan PM, et al. Accreditation process in European countries - an EFLM survey. Clin Chem Lab Med. 2016; 54:545-551.

Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures: ce qui va changer dans la pratique quotidienne

Julie Bruneau^{a,*}, Danielle Canioni^a, Thierry Jo Molina^{a,*}

RÉSUMÉ

L'Organisation Mondiale de la Santé va publier prochainement une édition révisée de la classification des tumeurs du tissu lymphoïde et du tissu hématopoïétique. Depuis la dernière édition publiée en 2008, les données de la recherche fondamentale et translationnelle en hématologie associées à l'avancée des techniques moléculaires et du diagnostic multidisciplinaire, ont permis de mieux caractériser et individualiser les différents sous-types de lymphomes. Cette revue reprend les principales modifications ainsi que les nouvelles entités provisoires ou définitives. De la lymphocytose B monoclonale au lymphome folliculaire de type pédiatrique, des modifications importantes apportées au groupe des lymphomes diffus à grandes cellules B ou à celui des lymphomes T périphériques, ces nouveautés seront incluses dans la prochaine édition de la classification des tumeurs du tissu lymphoïde.

Classification – lymphomes – OMS.

1. Introduction

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) vient de publier une synthèse de la révision de la classification OMS 2008 des néoplasies du tissu lymphoïde [1] (*tableau I*). Elle intègre comme dans les précédentes classifications les données cliniques pertinentes, les résultats des dernières recherches validées histopathologiques, phénotypiques, génétiques et moléculaires, microbiologiques. À côté des pathologistes et biologistes, un comité clinique était présent afin de valider la pertinence clinique de cette révision. Plusieurs nouvelles entités provisoires sont apparues, certaines entités provisoires sont devenues définitives. Cet article a pour but de mettre en avant les principaux changements inclus dans la classification OMS révisée 2016, et les modifications majeures à prendre en compte dans la pratique diagnostique courante en hématopathologie.

^a Service de Pathologie

Hôpital Universitaire Necker - Enfants Malades, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (APHP), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
149 rue de Sèvres, 75015 Paris

* Correspondance

julie.bruneau@aphp.fr, thierry.molina@aphp.fr

article reçu le 15 octobre 2016, accepté le 31 octobre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Revised WHO classification of the mature lymphoid neoplasms: What will change in our daily practice?

The World Health Organization is going to publish within the next few months the revised edition of the classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Since 2008, the data of the basic and translational research in haematology, associated with molecular and omic datas, and overall multidisciplinary diagnosis, allowed to better characterize and individualize the various lymphoma entities. This review summarizes the main changes for every lymphoma subset, taking into consideration new discoveries, and creation of new provisional or definitive entities. From monoclonal B cell lymphocytosis to paediatric-type follicular lymphoma, from large modifications brought in diffuse large B cell lymphoma group as well as in the peripheral T cell lymphoma group, these main modifications will be introduced in the next edition of the classification of lymphoid neoplasms.

Classification – lymphoma – lymphoid neoplasms – WHO.

2. Les principales modifications de la classification des lymphomes B

2.1. Leucémie lymphoïde chronique (LLC) / lymphome lymphocytaire et lymphocytose B monoclonale (MBL)

Dans la pratique courante en hématopathologie, la **lymphocytose B monoclonale (MBL)** doit être une entité connue du pathologiste. Elle est définie dans la classification OMS 2008 comme la présence d'au plus 5×10^9 G/L lymphocytes circulants pathologiques depuis plus de 3 mois, de phénotype LLC, LLC atypique ou non LLC (CD5-), en l'absence d'autre signe de lymphome. Nous savons aujourd'hui que cette entité dans la plupart des cas préexiste à toute LLC/lymphome lymphocytaire.

La classification révisée différencie une MBL à « faible taux » inférieur à 0.5×10^9 G/L qui a très peu de chance de progresser vers la LLC, d'une MBL à « taux élevé » qui nécessite un suivi médical annuel et a un phénotype et une pathologie moléculaire très similaire à la LLC de stade Rai 0,

Tableau I – Classification OMS révisée 2016 des tumeurs du tissu lymphoïde.

Néoplasies lymphoïdes B matures
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
Lymphocytose B monoclonale *
Leucémie pro-lymphocytaire B
Lymphome de la zone marginale splénique
Leucémie à tricholeucocytes
<i>Lymphome / Leucémie B splénique, non classable</i>
<i>Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique</i>
<i>Leucémie à tricholeucocytes - variant</i>
Lymphome lymphoplasmocytaire
Macroglobulinémie de Waldenström
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgM*
Maladie des chaînes lourdes Mu
Maladie des chaînes lourdes gamma
Maladie des chaînes lourdes alpha
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgG/IgA*
Myélome multiple
Plasmocytome solitaire osseux
Plasmocytome extra-osseux
Maladie des dépôts d'immunoglobuline monoclonaux*
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
<i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de type pédiatrique</i>
Lymphome folliculaire
Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> *
Lymphome folliculaire de type duodénal*
Lymphome folliculaire de type pédiatrique*
<i>Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4*</i>
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Néoplasie à cellules du manteau <i>in situ</i> *
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)
de type B du Centre germinatif*
de type Activé B*
Lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T/histiocytes
DLBCL primitif du système nerveux central
DLBCL primitif cutané, de type jambe
DLBCL EBV+, NOS*
<i>Ulçère cutanéomuqueux EBV+*</i>
DLBCL associé à une inflammation chronique
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin (thymique)
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
Lymphome à grandes cellules B ALK positif
Lymphome plasmablastique
Lymphome des séreuses
<i>DLBCL HHV8+, sans autre spécificité*</i>
Lymphome de Burkitt
<i>Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q</i>
Lymphome B de haut grade avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6*
Lymphome B de haut grade, NOS*
Lymphome B inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique

Néoplasies lymphoïdes T et NK matures
Leucémie prolymphocytaire T
Leucémie T à grands lymphocytes à grains (LGL)
<i>Syndrome lymphoprolifératif chronique à cellules NK</i>
Leucémie agressive à cellules NK
Lymphome T EBV+ systémique de l'enfance*
Syndrome lymphoprolifératif de type hydroa vacciniforme-like*
Leucémie/Lymphome T de l'adulte
Lymphome NK/T extraganglionnaire, de type nasal
Lymphome T associé à une entéropathie
Lymphome T monomorphe épithélioïde intestinal*
<i>Syndrome lymphoprolifératif T indolent du tube digestif*</i>
Lymphome T hépatosplénique
Lymphome T sous cutané de type panniculite
Mycosis fungoides
Syndrome de Sézary
Syndromes lymphoprolifératifs T CD30+ primitifs cutanés
Papulose lymphomatoïde
Lymphome à grandes cellules anaplasiques primitif cutané
Lymphome T gamma delta primitif cutané
<i>Lymphome T CD8+ cytotoxique agressif épidermotrope, primitif cutané</i>
<i>Lymphome T CD8+ acral primitif cutané*</i>
<i>Syndrome lymphoprolifératif T CD4+ à cellules petites et moyennes primitif cutané*</i>
Lymphome T périphérique, NOS
Lymphome T angioimmunoblastique
<i>Lymphome T folliculaire*</i>
<i>Lymphome T périphérique ganglionnaire de phénotype TFH*</i>
Lymphome à grandes cellules anaplasiques, ALK+
Lymphome à grandes cellules anaplasiques, ALK-*
<i>Lymphome à grandes cellules anaplasique, associé à un implant mammaire*</i>

Lymphomes de Hodgkin
Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire
Lymphome de Hodgkin classique
Lymphome de Hodgkin classique scléro-nodulaire
Lymphome de Hodgkin classique riche en lymphocytes
Lymphome de Hodgkin classique à cellularité mixte
Lymphome de Hodgkin classique en déplétion lymphoïde

Syndromes lymphoprolifératifs post transplantation (PTLD)
PTLD de type hyperplasie plasmocytaire
PTLD de type mononucléose infectieuse
PTLD de type hyperplasie lymphoïde folliculaire floride*
PTLD de type polymorphe
PTLD de type monomorphe (de type lymphoïde B, T ou NK)
PTLD de type lymphome de Hodgkin classique

Les Entités provisoires sont en italique; les modifications par rapport à la classification OMS 2008 comportent un astérisque (*).

bien que les cas hypermutés sur la région variable du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGH) sont plus fréquents dans les MBL. Une LLC ne peut être diagnostiquée en l'absence de maladie extramédullaire s'il y a moins de 5×10^9 G/L lymphocytes même s'il y a des cytopénies ou des symptômes liés à cette maladie.

Le concept d'atteinte tissulaire de la MBL est encore mal défini mais peut se discuter dans les cas de « lymphome lymphocytaire » qui ne semblent pas progresser. Ainsi, des cas de lymphome lymphocytaire/LLC sans centres de prolifération et chez des patients dont les adénopathies ne dépassent pas 1,5 cm pourraient représenter les équivalents tissulaires de la MBL mais cela reste à démontrer. Une MBL de type non-LLC est reconnue, reliée le plus souvent au lymphome de la zone marginale splénique.

La classification révisée 2016 met en avant l'importance des centres de proliférations dans la **leucémie lymphoïde chronique (LLC) / lymphome lymphocytaire**. Pour rappel, sur le plan histologique, on observe classiquement une destruction de l'architecture folliculaire ganglionnaire aux dépens d'une prolifération diffuse et monomorphe de petits lymphocytes au noyau arrondi et à chromatine dense (territoires sombres) alternant avec des plages plus claires (centres de proliférations) constituées de polylphocytes et para-immunoblastes. Les centres de proliférations donnent parfois un aspect pseudo-nodulaire trompeur et comportent une proportion supérieure de cellules en cycle. Lorsque leur aspect est large et confluent (ancien sous-type pseudotumoral de la classification de Kiel), et/ou que l'index de prolifération est important (Ki67), ceci est

associé à l'agressivité de la pathologie. Il n'est pas rare d'observer au sein des centres de prolifération une expression de la Cycline D1 (20-30 % des cas) et/ou une expression protéique de MYC, sans réarrangement associé au locus de *CCND1* ou de *MYC*.

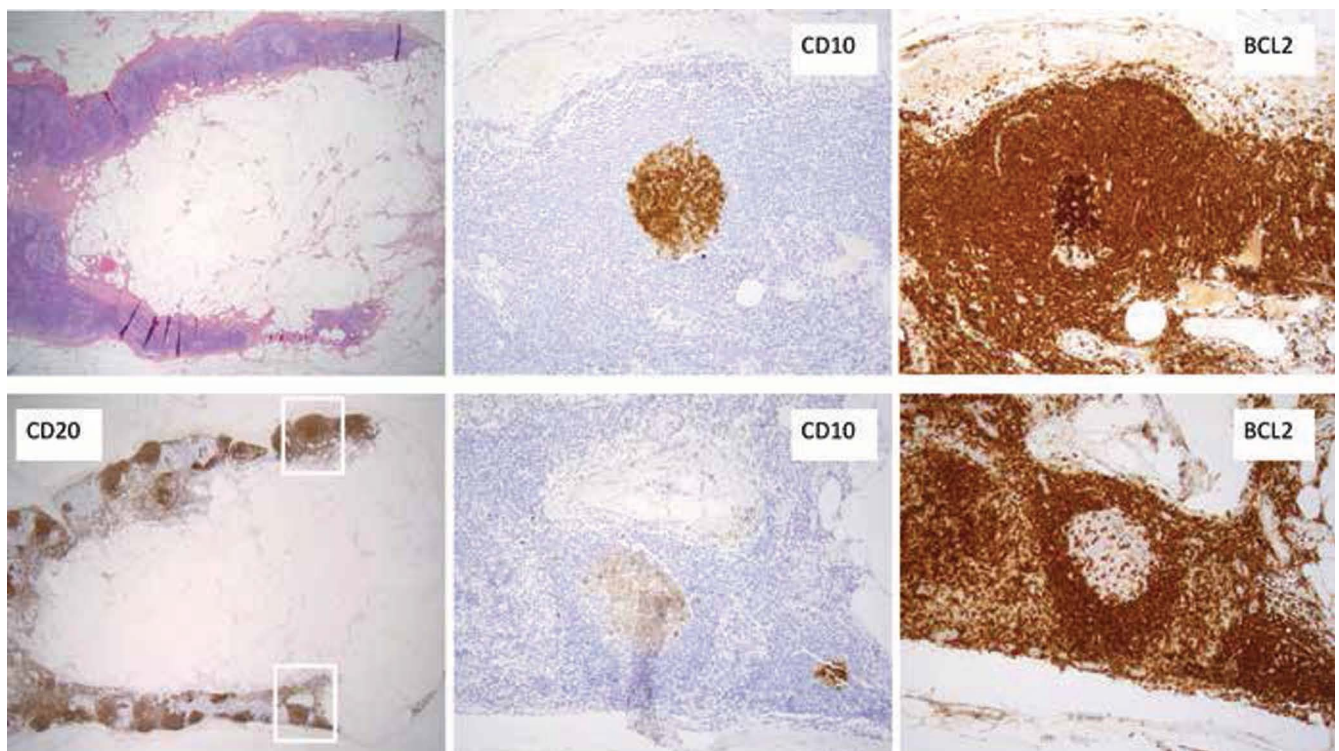
2.2. Les lymphomes folliculaires

Les lymphomes folliculaires représentent près de 30 % des lymphomes B non Hodgkiniens chez l'adulte. La classification des **lymphomes folliculaires de grade 1-2, 3a ou 3b** n'est pas modifiée. Pour rappel, elle se base sur le compte de centroblastes inférieur ou égal, ou supérieur à 15, par follicule, sur 10 follicules tumoraux à fort grossissement (x40), respectivement pour les grades 1-2 et 3a; et la présence de centroblastes sans centrocytes dans les follicules pour le grade 3b. Deux variants sont reconnus: la **néoplasie folliculaire *in situ*** et le **lymphome folliculaire de type duodénal**.

2.2.1. Néoplasie folliculaire *in situ*

Le lymphome folliculaire *in situ* est renommé **néoplasie folliculaire *in situ*** (*figure 1*) en raison de son faible risque de progression vers un lymphome. La néoplasie folliculaire *in situ* peut toutefois être associée à un lymphome folliculaire le précédant ou synchrone, soulignant l'importance de l'évaluation clinique. Ses critères diagnostiques sont inchangés, et il faut distinguer cette entité d'une atteinte ganglionnaire partielle d'un lymphome folliculaire de grade 1-2 qui a un risque de progression plus important. Par contre, le nombre de follicules anormaux, le degré d'atteinte

Figure 1 – Localisation inguinale d'une néoplasie folliculaire *in situ* chez un homme âgé de 67 ans.



Une partie des follicules lymphoïdes sont pathologiques et expriment vivement CD10 et BCL2, alors que les follicules lymphoïdes secondaires expriment CD10 plus faiblement et n'expriment pas BCL2. © Julie Bruneau

dans les follicules anormaux ou l'étendue des lésions *in situ* ne permettent pas de différencier ceux qui resteront *in situ* de ceux qui vont progresser vers un authentique lymphome. La néoplasie folliculaire *in situ* présente moins de gains ou de pertes génétiques que les lymphomes folliculaires avec atteinte partielle ou les lymphomes folliculaires classiques, même s'ils présentent des anomalies secondaires au réarrangement de *BCL2*.

2.2.2. Lymphome folliculaire de type duodénal

Parmi les lymphomes folliculaires du tube digestif considérés comme un variant du lymphome folliculaire, la nouvelle classification isole le lymphome folliculaire de type duodénal ayant des caractéristiques partagées entre la néoplasie folliculaire *in situ* et les lymphomes du MALT. Ces patients ont une excellente évolution et sont souvent suivis dans une stratégie de «*wait and watch*».

2.2.3. Lymphome folliculaire d'architecture diffus avec délétion 1p36

En dehors d'un problème d'échantillonnage, il y a un groupe de lymphome folliculaire d'architecture principalement diffuse se présentant souvent sous forme de larges masses inguinales et n'ayant pas de réarrangement de *BCL2* avec une délétion 1p36 non spécifique de cette entité.

2.2.4. Lymphome folliculaire de type pédiatrique

Le lymphome folliculaire pédiatrique est une entité définitive et non plus provisoire dans la classification révisée 2016 et renommée **lymphome folliculaire de type pédiatrique**. En effet, ce lymphome peut survenir chez l'adulte. Il s'agit d'une entité rare, le plus souvent de forme localisée.

Il s'agit d'identifier la présence de follicules lymphoïdes de grande taille au centre germinatif large et expansif, qui ont souvent une cytologie centrofolliculaire blastoïde plutôt que des centroblastes (ou des centrocytes). L'index de prolifération des centres germinatifs est parfois élevé. Les centres germinatifs expriment CD10, *BCL6* et l'expression de *BCL2* est négative ou faiblement positive.

Le lymphome folliculaire de type pédiatrique est caractérisé par l'absence de réarrangement des gènes *BCL2*, *MYC* et *BCL6*. Des pertes d'hétérozygotie ou des mutations du gène *TNFRSF14* (1p36) peuvent être retrouvées, ces anomalies étant présentes dans d'autres variants de lymphome folliculaire de l'adulte avec ou sans réarrangement du gène *BCL2* et des mutations de la voie MAPKinase [2,3].

La classification révisée 2016 distingue le **lymphome folliculaire du testicule**, à rapprocher du lymphome folliculaire de type pédiatrique. Il survient surtout chez l'enfant et plus rarement chez le jeune adulte. Sa morphologie se rapproche du lymphome folliculaire de grade 3a, sans réarrangement au locus de *BCL2*. Il est de bon pronostic.

La quasi totalité des cas publiés de lymphome folliculaire de type pédiatrique sont de stade localisé et l'exérèse chirurgicale associée à l'approche «*wait and watch strategy*» sont recommandées. Certaines études considèrent la possibilité que cette entité soit une prolifération clonale bénigne de cellules lymphoïdes du centre germinatif de faible grade de malignité. Cependant, chez l'adulte jeune, il faut être prudent et ne pas faire ce diagnostic par excès, le diagnostic différentiel de lymphome folliculaire de grade 3a doit être discuté.

Cette entité doit également exclure les cas avec des aires diffuses cohésives de grandes cellules devant faire évoquer une transformation en lymphome diffus à grandes cellules B.

2.2.5. Lymphome à grandes cellules avec réarrangement d'*IRF4*

La classification révisée 2016 propose une nouvelle entité provisoire nommée **lymphome à grandes cellules avec réarrangement d'*IRF4*** (figure 2). Comme le lymphome folliculaire de type pédiatrique, il survient plus fréquemment chez l'enfant et l'adulte jeune, de topographie localisée, principalement «tête et cou» (anneau de Waldeyer et région cervicale). L'architecture folliculaire est détruite par une prolifération d'architecture folliculaire et/ou diffuse, composée de lymphocytes B CD20+ de grande taille co-exprimant MUM1 et *BCL6*, avec un taux de prolifération élevé. L'aspect d'ensemble évoque le diagnostic de lymphome folliculaire de grade 3b ou de lymphome diffus à grandes cellules B. *BCL2* et CD10 sont exprimés dans plus de 50 % des cas, de rares cas co-expriment CD20 et CD5. Des réarrangements associés au locus de *BCL6* ont été décrits, mais il n'y a jamais de réarrangement de *BCL2*. De rares cas semblant appartenir à cette catégorie n'ont pas de réarrangement identifiable de *IRF-4* mais présentent une coexpression de *BCL6* et MUM-1.

Ce lymphome est considéré comme plus agressif que les lymphomes folliculaires de type pédiatrique ; toutefois leur évolution sous traitement est favorable et ces lymphomes sont considérés de bon pronostic.

2.3. Les lymphomes à cellules du manteau

Les études de lymphomagenèse des **lymphomes à cellules du manteau** comparant les présentations cliniques indolentes et agressives ont permis de mettre en évidence deux voies de lymphomagenèse de ce lymphome B dérivé de cellules naïves. Le lymphome à cellules du manteau de morphologie classique, ganglionnaire et extra-ganglionnaire, ainsi que les formes de morphologie agressive : blastoïde ou pléomorphe, sont issues de lymphocytes B ne portant pas ou peu de mutations du domaine variable du gène *IGH* et ils expriment SOX11.

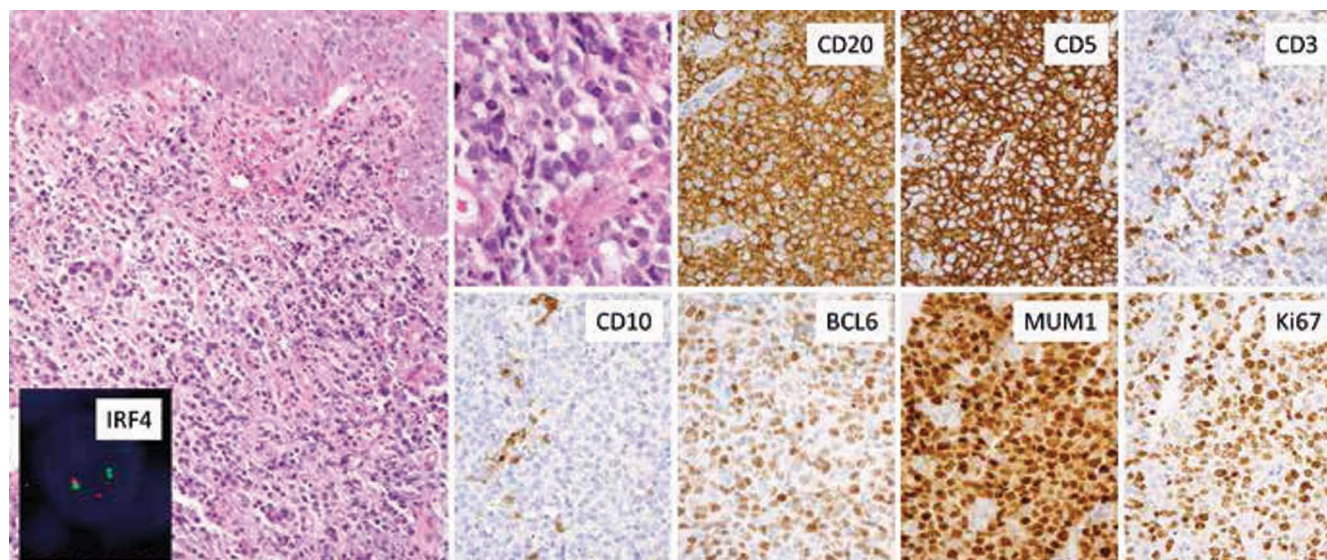
Les lymphomes à cellules du manteau de forme leucémique, médullaire et splénique, non ganglionnaire, cliniquement indolents, sont issus de lymphocytes B portant de nombreuses mutations du domaine variable du gène *IgH* et ils n'expriment pas SOX11. Cependant, des anomalies secondaires peuvent survenir impliquant souvent *TP53* et conduisant à une évolution très agressive.

Le lymphome à cellules du manteau *in situ* est renommé **néoplasie à cellules du manteau *in situ***. Les critères diagnostiques sont inchangés : il s'agit d'identifier la présence de lymphocytes B pathologiques Cycline D1+ dans la zone du manteau. C'est une entité rare qui doit être distinguée du lymphome à cellules du manteau classique présentant une topographie du manteau (figure 3).

2.4. Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL, Diffuse Large B-cell Lymphoma)

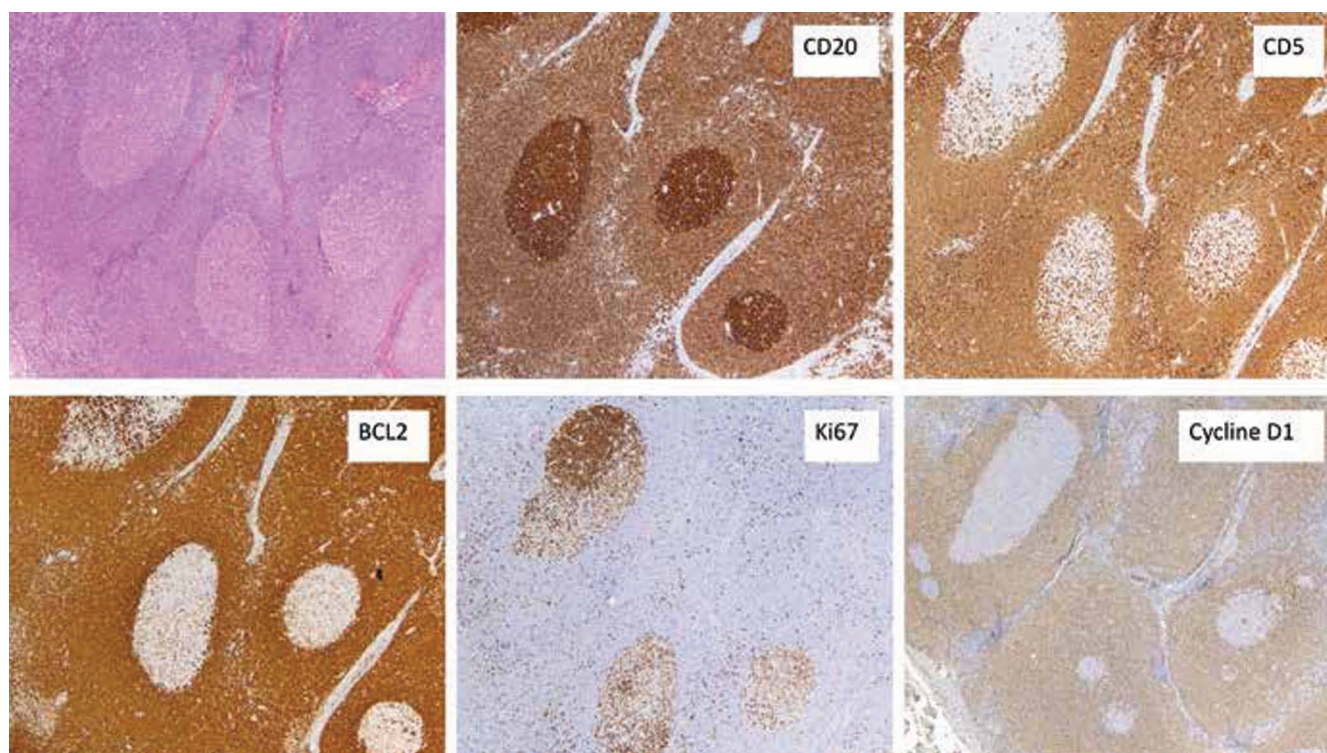
Les DLBCL sans autre spécificité (NOS, not otherwise specified) seront séparés dans la classification OMS 2016 en deux groupes : de type B du centre-germinatif et de type B activé, selon la classification dérivée de la cellule d'origine.

Figure 2 – Localisation amygdalienne chez une femme âgée de 27 ans d'un lymphome à grandes cellules B avec réarrangement d'*IRF4* (FISH), particulier par l'expression de CD5.



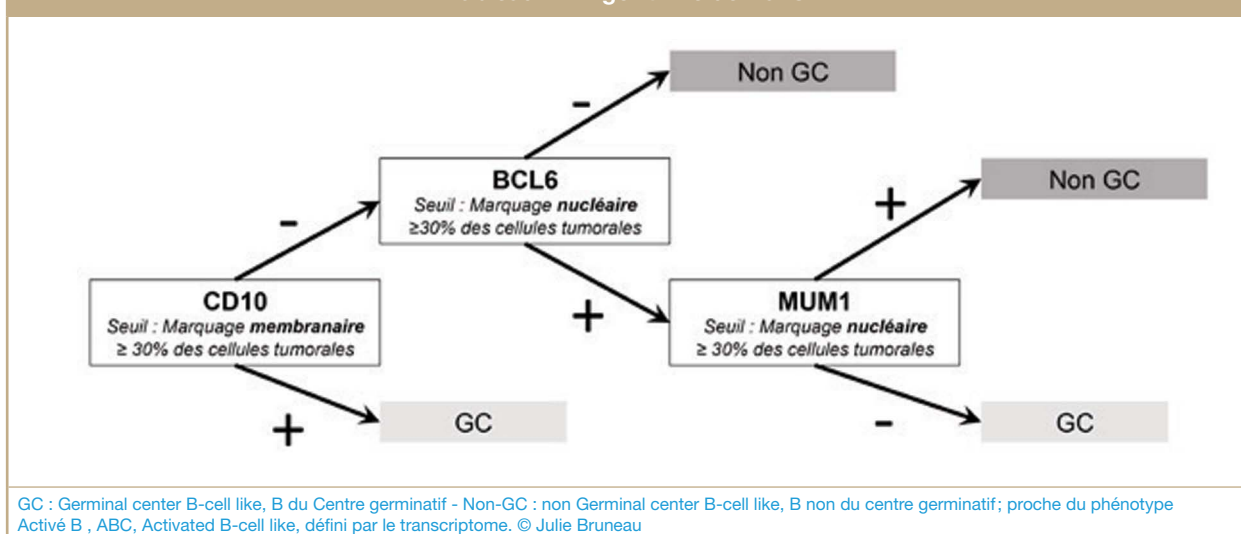
Les cellules tumorales n'expriment pas Cycline D1 ni CD30, CD21, CD23 et les anti-CD21 et anti-CD23 ne mettent pas en évidence de réseau de cellules folliculaires dendritiques résiduel, la sonde EBER est négative. Après exérèse complète, et réalisation d'un bilan d'extension négatif, une stratégie «wait and watch» a été adoptée, la patiente non traitée étant toujours en rémission après un suivi de 18 mois. © Julie Bruneau

Figure 3 – Localisation ganglionnaire d'un lymphome à cellules du manteau avec atteinte de la zone du manteau et persistance de centres germinatifs polarisés (Ki67) réactionnels BCL2 négatifs.



© Julie Bruneau

Tableau II – Algorithme de Hans.



Les données du profil d'expression, du séquençage par NGS, les anomalies chromosomiques, les voies de signalisation et les réponses au traitement ont clairement identifié ces deux groupes, laissant toutefois de côté 10 à 15 % de DLBCL NOS non classables par les données du transcriptome et de la NGS. La classification selon la cellule d'origine par immunohistochimie (algorithme de Hans basé sur l'expression différentielle de CD10, BCL6, MUM-1 (tableau II), ou autre) est considérée comme acceptable dans la mesure où les classifications moléculaires ne sont pas accessibles dans tous les laboratoires. Mais ces techniques immunohistochimiques posent les problèmes de discordance avec les techniques moléculaires, et de reproductibilité. Néanmoins, le développement de signatures d'expressions ciblées sur tissu fixé et inclus en paraffine (Nanostring, RT-MLPA [4]) ayant une très bonne corrélation avec le transcriptome, est très prometteur et représentera sans doute la technique de choix dans l'avenir.

Dans la nouvelle classification révisée, le phénotype double expresseur MYC+ BCL2+ détecté par immunohistochimie doit être isolé dans la mesure où de nombreuses études, mais pas toutes, suggèrent son importance pronostique mais ne doit pas faire considérer ce phénotype comme une catégorie séparée. L'expression de MYC est observée dans 30 à 50 % des cas et concomitante avec BCL2 dans 20 à 35 % des cas. Le seuil pour MYC est à 40 % et pour BCL2, celui recommandé est à 50 %. La plupart des cas n'ont pas de réarrangement des gènes MYC et BCL2.

L'évaluation de l'expression de CD30 semble également intéressante dans les DLBCL, NOS à visée pronostique et ce d'autant qu'elle représente une cible thérapeutique. Le lymphome inclassable entre un lymphome diffus à grandes cellules B et un lymphome de Burkitt (BCLU), entité provisoire de la classification OMS 2008, pour laquelle les pathologistes avaient du mal à être reproductibles dans la reconnaissance de cette entité, a été supprimée. La classification révisée 2016 propose par contre deux nouvelles entités :

- D'une part le **lymphome B de haut grade avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6 (figure 4)**.

Ce lymphome (appelé double ou triple hit) est souvent reconnu comme de très mauvais pronostic et ne répond

pas au traitement classique des DLBCL. Sa cytologie est variable et doit être précisée en complément : cytologie de lymphome diffus à grandes cellules, cytologie blastoïde, cytologie intermédiaire entre Burkitt et DLBCL. Par convention, les lymphomes folliculaires et les lymphomes lymphoblastiques B sont exclus de cette entité.

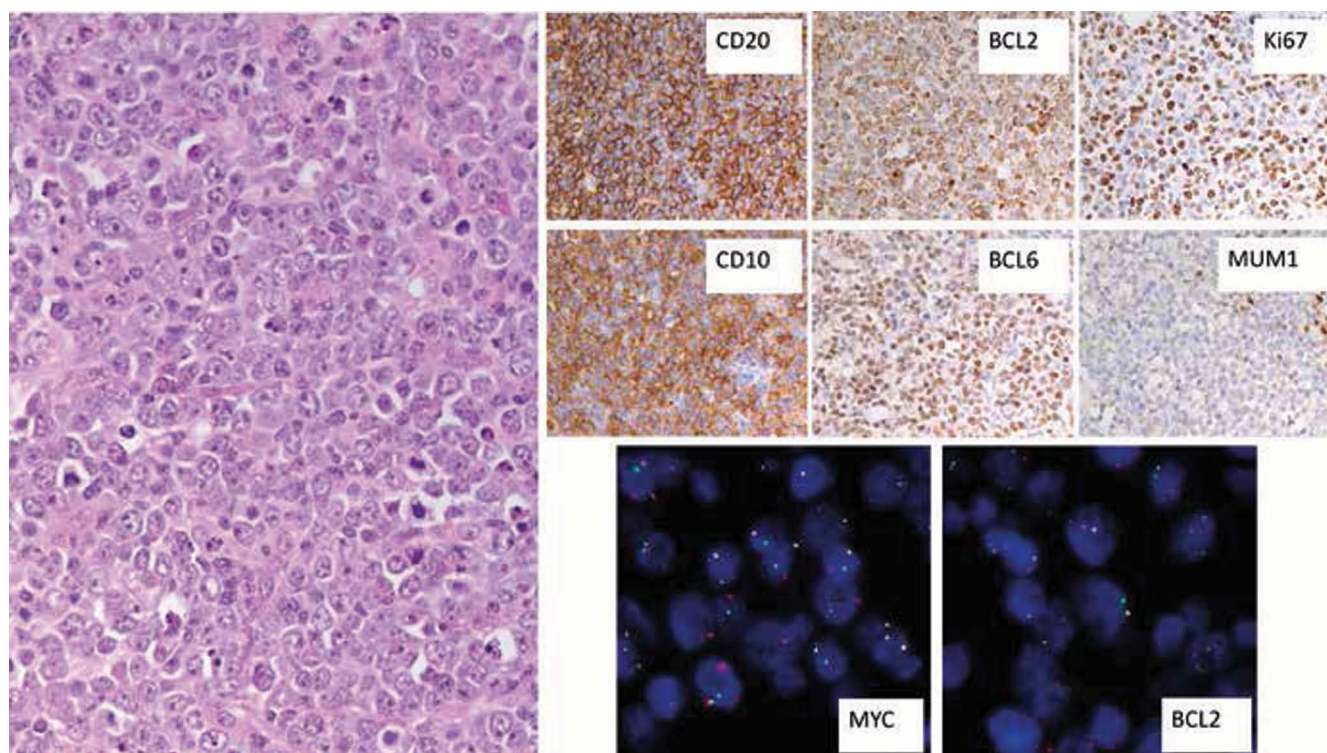
- D'autre part le **lymphome B de haut grade NOS** lorsqu'il n'y a pas de réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6, et si la cytologie est soit intermédiaire, soit blastoïde. De principe, une étude de l'expression de la TdT et de la Cycline D1 est impérative afin d'éliminer les lymphomes lymphoblastiques B et les lymphomes à cellules du manteau blastoïdes.

Ces entités posent la question de la pratique de l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) en routine dans les DLBCL pour la détection des réarrangements de MYC, BCL2 et BCL6, et pour laquelle il n'y a pas de consensus. Pour certains, la pratique doit être systématique alors que d'autres la limitent à des cas de DLBCL de phénotype GC et/ou de morphologie de haut grade, et/ou à des cas dont le pourcentage d'expression de MYC est supérieur à 40 %.

L'entité provisoire lymphome diffus à grandes cellules B EBV+ du sujet âgé a elle aussi été supprimée au profit d'une entité plus large renommée **lymphomes à grandes cellules B EBV+ sans autre spécificité (DLBCL EBV+, NOS)**. Il n'est donc plus restreint au lymphome du sujet âgé de plus de 50 ans. Cette entité intègre aussi le lymphome à grandes cellules B EBV+ du sujet jeune dont l'histologie peut être pléomorphe, associant des cellules de Reed-Sternberg, et le pronostic meilleur que chez le sujet âgé. Cette entité pose le problème de la pratique de la sonde EBER dans les DLBCL.

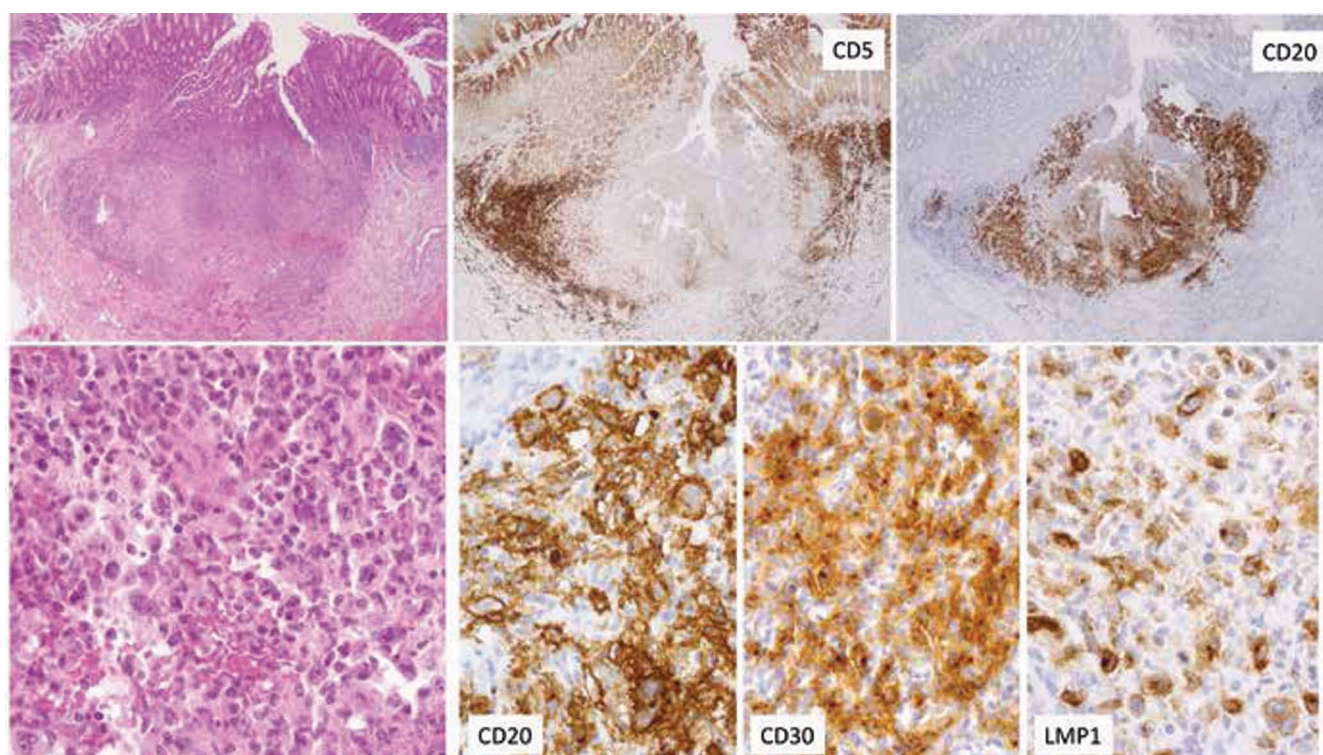
Les autres entités de lymphomes à grandes cellules B associées à l'EBV : la **granulomatose lymphomatøide** et le **lymphome à grandes cellules B associé à une inflammation chronique**, ne sont pas incluses dans les DLBCL EBV+, NOS.

Une nouvelle entité provisoire a été reconnue, nommée **ulcère muco-cutané EBV+ (figure 5)**. Il s'agit d'une lésion localisée et ulcérée développée aux dépens de la peau et/ou

Figure 4 – Localisation ganglionnaire d'un lymphome B de haut grade avec réarrangement de *MYC* et de *BCL2* (FISH).

© Julie Bruneau

Figure 5 – Localisation appendiculaire d'un ulcère muco-cutané associé à l'EBV survenu chez un patient transplanté rénal.



© Julie Bruneau

des muqueuses survenant chez l'immunodéprimé ou le sujet âgé [5-7]. Morphologiquement, il s'agit d'une lymphoprolifération polymorphe, on peut observer des cellules de taille petite à moyenne, des cellules immunoblastiques, des cellules de type Hodgkin ou Reed-Sternberg, de phénotype B. Des lésions de nécrose et d'angio-invasion sont également associées. L'expression du CD20 est positive et peut être diminuée sur certaines cellules tumorales. Elles expriment CD30 et LMP, voire CD15. L'index de prolifération Ki67 peut être élevé et l'aspect histologique proche de celui d'un lymphome diffus à grandes cellules B. Le pronostic est excellent et certains cas régressent spontanément.

2.5. Le lymphome de Burkitt

Dans la classification révisée 2016, l'accent est clairement mis sur l'identification d'une entité provisoire qui pose la question de l'existence de vrais lymphomes de Burkitt sans translocation de *MYC* : le **lymphome de type Burkitt-like comportant des aberrations du 11q** avec des gains proximaux et des pertes télomériques, sans réarrangement de *MYC*. En effet, la morphologie n'est pas toujours typique du lymphome de Burkitt, plus pléomorphe, avec focalement une architecture folliculaire possible et fréquemment une présentation ganglionnaire. Le caryotype est le plus souvent complexe et l'expression de *MYC* est plus faible.

3. Les principales modifications de la classification des lymphomes T

Les plus grandes avancées et modifications de la classification révisée 2016 portent sur les lymphomes T périphériques ganglionnaires et les lymphomes T angio-immunoblastiques. C'est grâce aux études génomiques et de profils d'expressions moléculaires que ce groupe a été démembré et de nouvelles entités diagnostiques, basées sur la cellule d'origine, ont été reclassées.

3.1. Lymphomes T ganglionnaires avec phénotype T folliculaire auxiliaire (TFH, T Folliculaire Helper)

Le groupe des lymphomes de phénotype TFH comporte maintenant plusieurs entités : le **lymphome T angio-immunoblastique**, le **lymphome T folliculaire**, le **lymphome T périphérique ganglionnaire de phénotype TFH**. Les critères diagnostiques sont inchangés. Ces lymphomes d'origine lymphoïde T folliculaire helper (TFH) doivent exprimer au moins deux marqueurs TFH parmi CD10, BCL6, PD1, CXCL13, SAP et CCR5. Ces lymphomes d'origine TFH partagent aussi un profil mutationnel intéressant notamment *TET2*, *IDH2*, *DNMT3A*, *RHOA*, *CD28* ainsi que des fusions *ITK-SYK* ou *CTLA4-CD28*...

3.2. Lymphomes T périphériques ganglionnaires, sans autre spécificité (PTCL NOS)

C'est un diagnostic d'élimination. Les études moléculaires corrélées aux études phénotypiques ont permis d'identifier trois groupes de profil immunologique différent : le phéno-

type Th1 (expression de TBX21/TBET), le phénotype Th2 (GATA3) et le phénotype cytotoxique. Il existe un impact pronostique péjoratif pour les lymphomes de phénotype Th2 exprimant GATA3 [8].

Ces entités sont signalées dans la classification mais elles ne sont pas individualisées comme entités à part entière, tout comme le PTCL, NOS particulier par l'expression du CD30 et qui fait discuter le diagnostic différentiel de lymphome à grandes cellules anaplasiques ALK négatif.

3.3. Lymphomes à grandes cellules anaplasiques

Il s'agit de déterminer l'expression de ALK1 par les grandes cellules de morphologie anaplasique.

Le **lymphome à grandes cellules anaplasiques ALK négatif (ALCL-ALK-)**, entité provisoire de la classification OMS 2008, est aujourd'hui reconnu comme une entité à part entière de la classification révisée 2016. Il doit être reconnu et différencié des PTCL, NOS CD30+. Les ALCL-ALK- partagent les critères morphologiques diagnostiques des ALCL-ALK+ : il s'agit de plages de cellules de grande taille cohésives avec présence de cellules « *hallmark-like* » exprimant vivement CD30, pouvant comporter une composante intra-sinuale. La majorité des cas exprime EMA et les antigènes de cytotoxicité, et a perdu l'expression des antigènes lymphoïdes T (CD2, CD3, CD5, CD7). Les récentes études moléculaires ont mis en évidence des mutations activatrices de *JAK1* +/- *STAT3*. Le pronostic des patients atteints d'ALCL-ALK- est péjoratif. Les études de cytogénétique moléculaire montrent que les ALCL-ALK- associés à un remaniement au locus de *DUSP22/IRF4* (6p25.3) sont de meilleur pronostic, comparable à celui des patients atteints d'ALCL-ALK+. Au contraire, les remaniements du locus de *TP63* (3q28) confèrent un pronostic particulièrement péjoratif. Il est recommandé de rechercher ces remaniements dans tous les cas d'ALCL-ALK-.

Le **lymphome à grandes cellules anaplasiques ALK-associé à une prothèse mammaire** est une nouvelle entité provisoire incluse dans la classification révisée 2016. Il s'agit d'un lymphome développé au contact de la capsule de l'implant mammaire, avec le plus souvent un envahissement local et plus rarement régional avec métastases ganglionnaires ou systémiques. Ils sont de bon pronostic.

3.4. Lymphomes et lymphoproliférations T primitives du tube digestif

Les lymphomes T associés à une entéropathie de type 1 et 2 (EATL de type 1 et 2) sont respectivement renommés : **lymphome T associé à une entéropathie (EATL)**, dans un contexte de maladie coeliaque, préférentiellement de phénotype TCR $\alpha\beta$, CD3+, CD8-, CD4-, CD56-, et **lymphome T intestinal monomorphe épithéliotrope (MEITL)** où la prolifération cellulaire est composée de cellules de taille moyenne préférentiellement de phénotype TCR $\gamma\delta$, CD3+, CD8+, CD4-.

Sur le plan génétique, des mutations de *STAT5B* et *JAK3* ont été mises en évidence dans ces deux types de lymphome T primitif intestinal, ainsi que des amplifications de *MYC* dans les MEITL.

Au contraire des lymphomes T agressifs associés à une entéropathie ou épithéliotropes, une nouvelle entité provisoire a été incluse dans la classification révisée 2016 : la **lymphoprolifération T indolente du tube digestif**, de phénotype T CD8+ le plus souvent. Peu de cas ont été rapportés dans la littérature. L'infiltration par de petits lymphocytes T CD8+ (TCR $\alpha\beta$) de phénotype cytotoxique non activé (TIA1+ et Granzyme B négatif), est limitée à la muqueuse et peut siéger sur l'ensemble du tube digestif. Il n'y a pas d'épithéliotropisme, l'index de prolifération est faible, et cette entité n'est pas associée à l'EBV.

3.5. Lymphomes et lymphoproliférations primitives cutanées

Les présentations cliniques sont variées et permettent d'orienter le diagnostic.

L'entité des **lymphoproliférations primitives cutanées T CD30+** reste inchangée, comportant deux entités distinctes : la **papulose lymphomatoïde** et le **lymphome anaplasique primitif cutané**. Ces deux entités ont bénéficié de plusieurs études moléculaires mettant notamment en évidence le réarrangement au locus de *DUSP22/IRF4*, identique aux ALCL-ALK-, suggérant une lymphomagenèse commune à ces entités.

Dans la classification révisée 2016, trois nouveaux sous-types de papulose lymphomatoïde sont référencés et inclus, en plus des sous-types A, B et C :

- D : papulose lymphomatoïde mimant un lymphome primitif cutané épidermotrope agressif T CD8+ cytotoxique.
- E : papulose lymphomatoïde angio-invasive.
- Papulose lymphomatoïde avec remaniement au locus de *DUSP22/IRF4*.

Le lymphome T CD4+ primitif cutané à cellules petites et moyennes est maintenant considéré comme une lymphoprolifération dans la nouvelle classification révisée 2016, et renommé : **lymphoprolifération T CD4+ primitive cutanée**, c'est la principale nouveauté car cette entité est d'évolution clinique indolente et de potentiel malin incertain. Il s'agit d'une lésion cutanée nodulaire le plus souvent localisée à la tête et au cuir chevelu. Parfois de diagnostic difficile, l'immunophénotypage peut révéler la présence de nombreux lymphocytes B, masquant la lymphoprolifération T de phénotype TFH qui exprime CD3, CD4 et PD1. Il ne faut pas hésiter à demander une étude de clonalité lymphoïde B et T, qui révélera la présence d'un réarrangement clonal du *TCR* et, le plus souvent, l'absence de réarrangement clonal d'*IGH*. Cette pathologie est de bon pronostic pour les lésions mesurant moins de 3 cm. Les formes disséminées sont rares et nécessitent un traitement systémique.

Les lymphoproliférations T CD8+ indolente de l'oreille décrite en 2007 ont été incluses dans la nouvelle classification révisée 2016 sous forme d'une nouvelle entité provisoire : le **lymphome T CD8+ primitif cutané acral**, évoluant du statut de lymphoprolifération à celui de lymphome. Il s'agit d'une lésion nodulaire de l'oreille ou de topographie acrale, localisée. Histologiquement, il s'agit d'une population dense et monomorphe de petits lymphocytes T CD8+, non épithéliotrope.

Des récurrences locales sont décrites, sans progression, cette pathologie est de bon pronostic.

3.6. Lymphomes T et NK EBV positif

En dehors du lymphome T/NK extranodal de type nasal, ils comprennent notamment chez l'enfant deux groupes : l'infection EBV+ chronique active (CA-EBV) et le lymphome T systémique EBV+ de l'enfance [9,10]. Ces deux entités sont décrites surtout en Asie, en Amérique centrale, en Amérique du Sud et au Mexique. Le CA-EBV T/NK a une présentation clinique variable, indolente, localisée de type hydroa-vacciniforme like, ou réaction sévère allergique à la piqûre de moustique, jusqu'à une forme systémique avec fièvre, hépatosplénomégalie et lymphadénopathies avec ou sans manifestations cutanées.

Le lymphome T systémique EBV+ de l'enfance a une présentation clinique bruyante avec souvent un syndrome d'activation macrophagique hémophagocytaire. Le diagnostic différentiel est la lymphohistiocytose hémophagocytaire aiguë EBV associée (HLH), qui peut être cliniquement très bruyante, mais n'est pas néoplasique.

Une entité incluse dans le groupe des PTCL, NOS est représentée par les PTCL EBV+ ganglionnaire. Ils se présentent plus souvent chez l'adulte et peuvent se voir dans le contexte post-transplantation ou autre immunodéficience.

4. Les principales modifications de la classification des lymphomes de Hodgkin

La classification des lymphomes de Hodgkin de type classique (CHL) ou nodulaire à prédominance lymphocytaire (NLPHL) n'est pas modifiée. Cependant, les dogmes évoluent autour du NLPHL.

Il s'agit dans un premier temps de reconnaître des parentés entre cette entité et le lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T et/ou en histiocytes (THRLBCL). La biologie moléculaire a en effet permis de mettre en évidence des profils d'expressions géniques similaires entre le NLPHL et le THRLBCL, et confirme ce que les pathologistes suggèrent depuis de nombreuses années. En effet, certains NLPHL présentent des aspects histologiques diffus très riches en lymphocytes T. La nouvelle classification révisée 2016 recommande ainsi de préciser ces aspects architecturaux dans le compte-rendu, notamment l'enrichissement en lymphocytes T et la perte de l'architecture nodulaire sous la forme d'une transformation du NLPHL en THRLBCL-like dont la présentation clinique est plus agressive avec un taux de rechute élevé, sans preuve absolue à ce stade d'une réelle transformation en lymphome diffus à grandes cellules B.

Dans un second temps, concernant le sous-type particulier de lymphome de Hodgkin classique riche en lymphocytes, il s'agit d'une entité rare et de diagnostic difficile avec parfois des aspects histologiques intermédiaires entre un CHL et un NLPHL.

5. Conclusion

Cette nouvelle classification s'enrichit principalement des nouvelles données moléculaires génomiques (mutations, translocations) et de profil d'expression (ARNm, protéine) mais également d'une meilleure compréhension des données histopathologiques et des présentations cliniques associées.

Ainsi, cette classification est-elle toujours basée sur une approche multidisciplinaire pour chaque entité avec un objectif clair d'identification précise et de recherche de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien sur les cellules tumorales que sur le microenvironnement.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127(20):2375-90.
- [2] Schmidt J, Gong S, Marafioti T et al. Genome-wide analysis of pediatric-type follicular lymphoma reveals low genetic complexity and recurrent alterations of TNFRSF14 gene. *Blood* 2016; 128(8):1101-11.
- [3] Louissaint A Jr, Schafernak KT, Geyer JT et al. Pediatric-type nodal follicular lymphoma: a biologically distinct lymphoma with frequent MAPK pathway mutations. *Blood* 2016; 128(8):1093-100.
- [4] Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn*. 2015; 17(3):273-283
- [5] Dojcinov SD, Venkataraman G, Raffeld M et al. EBV positive mucocutaneous ulcer—a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34(3):405-417.
- [6] Hart M, Thakral B, Yohe S, et al. EBV-positive mucocutaneous ulcer in organ transplant recipients: a localized indolent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(11):1522-1529.
- [7] Gratzinger D, Jaffe ES. Mucocutaneous ulcer: a mimic of EBV+ diffuse large B cell lymphoma in the immunodeficiency setting. *Leuk Lymphoma*. 2016 57(8):1982-3.
- [8] Wang T, Feldman AL, Wada DA, et al. GATA-3 expression identifies a high-risk subset of PTCL, NOS with distinct molecular and clinical features. *Blood*. 2014;123(19):3007-3015.
- [9] Quintanilla-Martinez L., Ridaura C., Nagl F. et al. Hydroa vacciniforme-like lymphoma: a chronic EBV+ lymphoproliferative disorder with risk to develop a systemic lymphoma. *Blood* 2013; 122:3101-3110
- [10] Paik JH, Choe JY, Kim H et al. Clinicopathological categorization of Epstein-Barr virus-positive T/NK-cell lymphoproliferative disease: an analysis of 42 cases with an emphasis on prognostic implications. *Leuk Lymphoma*. 2017; 58(1):53-63.

Prise en charge anatomo-pathologique des tumeurs pédiatriques

Louise Galmiche^a

RÉSUMÉ

Les tumeurs pédiatriques regroupent des entités très variées, toutes rares en comparaison des tumeurs observées chez l'adulte. Certaines, en particulier les tumeurs du blastème, sont spécifiques à l'enfant. Une autre particularité des tumeurs pédiatriques est leur survenue dans 10 % des cas dans un contexte de prédisposition génétique. La prise en charge des cancers pédiatriques s'est considérablement améliorée au cours des dernières décennies mais ils restent responsables d'une importante morbidité. Le rôle du pathologiste demeure central dans la prise en charge de ces tumeurs en ce qui concerne la gestion du prélèvement, le diagnostic et l'élaboration de critères pronostiques, auxquels viennent s'ajouter maintenant des immunomarquages en vue du traitement par des thérapies ciblées.

Les exemples des neuroblastomes, des néphroblastomes et des rhabdomyosarcomes sont ici traités afin d'illustrer la spécificité de la prise en charge des cancers pédiatriques.

Anatomopathologie - cancer - enfant - néphroblastome - neuroblastome - rhabdomyosarcome - tumeur à petites cellules rondes basophiles.

SUMMARY

Pathological management of pediatric tumors

Pediatric cancers are uncommon and contain numerous heterogeneous entities. Among these tumors, some are specific to children, especially blastemal tumors. Pediatric cancers are also characterized by genetic predisposition in 10 % of cases. During past decades, improvement in clinical care of pediatric cancer has led to greatly increased survival. However morbidity and mortality still remain to be improved.

The role of the pathologist remains crucial for management of pediatric cancer. It is his duty to correctly manage fresh tissue for frozen and formalin fixed material, perform adequate diagnosis and immunostaining for targeted therapies, establish prognostic criteria. Here are developed management of neuroblastoma, nephroblastoma and rhabdomyosarcoma in order to illustrate pathological management of pediatric tumors.

Pathology - cancer - child - nephroblastoma - neuroblastoma - rhabdomyosarcoma - small round blue cell tumor.

1. Introduction

Les cancers de l'enfant sont des maladies rares intéressant 1 enfant sur 500 en France. 1 % des cancers sont observés avant l'âge de 15 ans. On estime qu'environ 1 700 enfants de moins de 15 ans ont un diagnostic de cancer chaque année en France [1]. Malgré cette faible incidence comparée à l'adulte, le cancer est la 2^e cause de décès avant 15 ans. Ces données épidémiologiques sont globalement comparables à celles des autres pays industrialisés [2, 3, 4].

Le sexe ratio tous types confondus est de 1,2 mais ce sexe ratio varie selon le type de tumeur. Les lymphomes, les médulloblastomes, les sarcomes et les tumeurs osseuses prédominent nettement chez les garçons ; les tumeurs germinales, les mélanomes et les carcinomes thyroïdiens sont plus fréquentes chez les filles.

^a Service d'Anatomie Pathologique

Hôpital Necker-Enfants Malades
149 rue de Sèvres
75015 Paris

Correspondance

louise.galmiche-rolland@aphp.fr

Les entités diagnostiquées sont très différentes chez l'enfant, avec des variations selon la classe d'âge. De 0 à 18 ans, les cancers les plus fréquents sont les leucémies, les tumeurs du système nerveux central et les lymphomes. Une étude épidémiologique réalisée en France en 2004 rapporte 30,2 % de leucémies, 21,8 % de tumeurs du système nerveux central et 12,4 % de lymphomes et maladie de Hodgkin [5]. 45 % des cancers sont diagnostiqués avant 5 ans, dont 71,8 % de tumeurs embryonnaires (néphroblastome, hépatoblastome, rétinoblastome et neuroblastome) dans cette classe d'âge. Les carcinomes sont extrêmement rares dans la population pédiatrique. L'incidence des lymphomes, des tumeurs osseuses malignes et épithéliales augmente avec l'âge. L'incidence des leucémies et des tumeurs du système nerveux central diminue avec l'âge. Avant l'âge d'un an, les tumeurs du système nerveux sympathique (SNS), les leucémies et les tumeurs du système nerveux central (SNC) prédominent. Entre 1 et 5 ans, les leucémies sont les plus fréquentes avec les tumeurs du SNC, les tumeurs du SNS et les tumeurs rénales. Entre 5 et 9 ans, les leucémies et les tumeurs du SNC demeurent les cancers les plus diagnostiqués, avec les lymphomes. Entre 10 et 14 ans, ces 3 types de cancer restent majoritaires devant les tumeurs osseuses.

2 % des cancers de l'enfant surviennent en période néonatale (dans le 1^{er} mois de vie). Il s'agit principalement de tératomes et de neuroblastomes [6].

article reçu le 15 février 2016, accepté le 6 avril 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Les cancers de l'enfant regroupent donc des entités très différentes et hétérogènes, tant du point de vue de leur histogénèse que de leur comportement et de leur traitement.

À ce jour, la survie à 5 ans après un cancer pédiatrique est de 80 % [7]. Cette survie s'est considérablement améliorée au cours des 30 dernières années grâce à un diagnostic plus précoce, une prise en charge multidisciplinaire et l'inclusion des enfants et adolescents dans des protocoles de soins nationaux et internationaux. On estime que 10 % des cancers pédiatriques sont liés à une prédisposition génétique [8]. Cette prédisposition génétique est suspectée devant l'existence d'antécédents familiaux de cancers, l'apparition d'une tumeur à un âge particulièrement jeune, la plurifocalité des lésions primitives ou l'existence d'une maladie génétique sous-jacente. Il est important d'identifier une éventuelle prédisposition pour le traitement et le suivi du patient ainsi que pour l'exploration et la prise en charge des apparentés.

Jusqu'à une période assez récente, ces prédispositions correspondaient à un mode de transmission simple associé à une forte pénétrance (exemple du gène RB). Une telle transmission reste prépondérante parmi les cancers de l'enfant. Ainsi, une étude récente a montré la présence de mutations germinales dans des gènes de prédisposition au cancer chez 8,5 % des enfants et adolescents ayant développé un cancer, et ce par des techniques de séquençage haut débit chez 1 120 patients [9]. Le gène TP53 est le plus fréquemment muté dans cette série. Seuls 40 % de ces patients présentent une histoire familiale évocatrice de prédisposition génétique. Depuis quelques années, des prédispositions au déterminisme plus complexe sont de plus en plus souvent mises en évidence.

En France, un registre appelé TED (Tumeurs et Développement) est mis en place depuis quelques années afin d'enregistrer tous les cancers pédiatriques associés à une anomalie de développement quelle qu'elle soit [10]. Compte tenu de la spécificité de la prise en charge des cancers pédiatriques, l'activité de cancérologie pédiatrique se concentre essentiellement dans les centres hospitaliers universitaires et les centres de lutte contre le cancer. Toutefois, le diagnostic de certains cancers pédiatriques peut ne pas avoir été suspecté au moment du prélèvement. Le rôle de l'anatomopathologiste est, dans tous les cas, central et il lui appartient de gérer de façon optimale toute biopsie et pièce d'exérèse de « nodules » ou « masses » pédiatriques.

2. Prise en charge anatomopathologique des cancers de l'enfant

Le pathologiste est confronté à des prélèvements pour lesquels il y a soit une demande de diagnostic de la tumeur soit une exérèse chirurgicale tumorale, le plus souvent après un traitement néoadjuvant. Le prélèvement peut donc consister en une biopsie (à l'aiguille ou chirurgicale) ou une pièce d'exérèse chirurgicale.

2.1. Prise en charge des biopsies de tumeurs solides pédiatriques à visée diagnostique

Le pathologiste doit être prévenu et informé du dossier. Il est important d'avoir connaissance de la localisation de la lésion, des circonstances d'apparition, de l'aspect radiologique, d'un éventuel traitement préalable (en particulier chimiothérapie et/ou radiothérapie).

Il est indispensable que tout prélèvement pour lequel une tumeur maligne est suspectée soit adressé à l'état frais au laboratoire d'Anatomie Pathologique, de façon rapide (idéalement dans les 15 min suivant le prélèvement). En pratique, les biopsies sont envoyées dans une compresse non tissée ou un papier filtre, toujours bien imbibés de serum physiologique.

Le prélèvement est placé sous une hotte à flux laminaire (prélèvement stérile) en cas de suspicion de lymphome ou si un prélèvement à visée microbiologique est prévu. Dans les autres situations, l'échantillon peut être traité en pièce de macroscopie, de façon non stérile.

Des appositions peuvent être facilement réalisées quelle que soit la taille du prélèvement. Les lames sont séchées à l'air, non fixées ; certaines sont colorées (MGG), permettant d'apprécier la richesse cellulaire, d'orienter le diagnostic et éventuellement d'orienter d'autres prélèvements. Les lames non colorées peuvent servir à la réalisation d'une étude en FISH à la recherche d'une amplification génique (exemple de la recherche d'amplification de N-MYC dans le neuroblastome), d'autres anomalies par des sondes de fission (breakapart) ou de fusion (exemple de la recherche de réarrangement du gène EWS dans le sarcome d'Ewing). De façon systématique, un ou des fragments tumoraux doivent être congelés. Le nombre de fragments congelés dépend en 1^{er} lieu de la taille de l'échantillon et de son caractère nécrotique. Les congélations peuvent se faire en cryotubes ou en cryomolds. Il est intéressant de réaliser des cassettes miroir dans le cas de la congélation en cryotube. Les échantillons congelés sont nécessaires aux analyses de biologie moléculaire (RT-PCR à la recherche de transcrits de fusion spécifiques de tumeurs, analyse du réarrangement des gènes des immunoglobulines,...). Il est important de réaliser des congélations à visée sanitaire et à visée de recherche dès que le matériel est suffisant. Si un lymphome est suspecté, une suspension cellulaire est réalisée en RPMI stérile à température ambiante pour étude en cytométrie de flux. Un fragment peut aussi être placé en RPMI pour réalisation d'un caryotype : un tel examen nécessite un fragment d'au moins 7 à 8 mm. Il est important de noter que seules ces techniques de cytométrie de flux et de cytogénétique conventionnelle requièrent impérativement du matériel frais. Un fragment frais peut être adressé en microbiologie si besoin. Une telle étude peut aussi être faite sur prélèvement congelé par des PCR spécifiques. Il faut s'assurer qu'une partie suffisante de la tumeur est fixée en formol tamponné 10 %. Dans le cas de pièces et d'exérèses plus volumineuses, il est souvent utile de fixer un petit fragment de façon rapide de façon à avoir des coupes dès le lendemain.

Il appartient donc au pathologiste de gérer de façon optimale le prélèvement qui lui est adressé en tenant compte des diagnostics suspectés et de la taille du prélèvement.

Tableau I : Principaux marqueurs exprimés dans les tumeurs à petites cellules rondes pédiatriques selon leur nature.

	CK	EMA	desmine	myogénine	CD3	CD79a	TdT	Phox2B	synaptophysine	CD99
NBL	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ewing Ewing-like	-/+	-/+	- (+ rare)	-	-	-	-	-	+/-	+
RMS	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
LLB/T	-	-	-	-	-/+	+/-	+	-	-	+
TDCR	+	+	+	-	-	-	-	-	-	- (+rare)
SS	+/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-

L'expression de CD99 est considérée uniquement s'il s'agit d'une expression membranaire. NBL : neuroblastome; RMS : rhabdomyosarcome; LLB/T : lymphome lymphoblastique B/T; TDCR : tumeur desmoplasique à cellules rondes; SS : synoviosarcome.

Dans certains cas, un **examen extemporané** peut être demandé ou proposé par le pathologiste. Dans le cadre d'une biopsie, cet examen peut aider à gérer correctement le prélèvement et guider le médecin préleveur : il permet alors de s'assurer que le matériel adressé intéresse la tumeur, qu'il n'est pas nécrosé et que son volume suffira au diagnostic histologique et moléculaire.

L'examen extemporané peut aider au diagnostic de malignité : il s'agit le plus souvent du diagnostic extemporané de tumeur à petites cellules rondes, ce qui impose de différer le diagnostic histologique précis, celui-ci ne pouvant alors être porté qu'après analyse histologique standard sur prélèvement fixé et inclus en paraffine.

Enfin, la dernière grande indication de l'examen extemporané en pathologie pédiatrique est l'appréciation des recoups tumorales. Cette indication intéresse principalement les tumeurs osseuses (recoupe osseuse chirurgicale d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing) et les hépatoblastomes.

2.2. Tumeurs à petites cellules rondes

Le groupe des tumeurs à petites cellules rondes est un groupe hétérogène de tumeurs agressives constitué majoritairement de cellules de taille plutôt moyenne, peu ou indifférenciées, au rapport nucléo-cytoplasmique élevé et au noyau souvent arrondi et hyperchromatique. L'étude immunohistochimique est un complément nécessaire à l'examen histologique standard. Néanmoins, il est important de souligner qu'aucun marqueur immunohistochimique n'est spécifique d'un type histologique et qu'aucun diagnostic ne doit, dans ce contexte, être porté sur le résultat d'un seul marqueur. Les immunohistochimies négatives sont aussi importantes que les immunohistochimies positives. Le diagnostic sur biopsie doit être particulièrement prudent. Chez l'enfant et l'adolescent, plusieurs étiologies principales peuvent être évoquées. Les tumeurs à petites cellules rondes pédiatriques les plus fréquentes sont : les tumeurs du groupe Ewing, les leucémies/lymphomes non hodgkiniens en particulier les leucémies/lymphomes lymphoblastiques, les neuroblastomes, les rhabdomyosarcomes (surtout alvéolaires), les tumeurs desmoplasiques à petites cellules, les synoviosarcomes. D'autres types tumoraux sont plus rarement rencontrés (tumeur neuroectodermique mélanotique, carcinome à translocation de type NUT, ostéosarcome à petites cellules rondes, tumeur rhabdoïde,...). Il est important d'examiner soigneusement la tumeur à la recherche de signes d'orientation morphologique pouvant

être très focaux : neuropile orientant vers un neuroblastome, cellules rhabdomyoblastiques (parfois sous forme de rares cellules au cytoplasme éosinophile) orientant vers un rhabdomyosarcome, stroma fibreux orientant vers une tumeur desmoplasique à cellules rondes ou une tumeur neuroectodermique mélanotique (pour cette entité, on recherchera la présence de pigment mélanique).

En l'absence de signes morphologiques d'orientation, on peut proposer, en 1^{re} intention, le panel d'anticorps suivant : cytokératines, EMA, Desmine, Myogénine, CD3, TdT, CD79a, Phox2B, synaptophysine, CD99.

Dans la majorité des cas, un panel de ce type permet de porter un diagnostic histologique (**tableau I**). L'expression conjointe de la desmine et de la myogénine permet le diagnostic de rhabdomyosarcome. Les tumeurs desmoplasiques à cellules rondes expriment la desmine et leur diagnostic nécessitera une étude immunohistochimique complémentaire, notamment le WT1. Les neuroblastomes sont caractérisés par l'expression de la synaptophysine et, de façon beaucoup plus spécifique, de Phox2B, facteur de transcription spécifique du système nerveux autonome. Les marqueurs lymphoïdes CD3, CD79a et TdT permettent de détecter les lymphomes lymphoblastiques T et B. Les cytokératines et l'EMA sont exprimés par le synoviosarcome. Le CD99 exprimé de manière isolée permet d'orienter vers le diagnostic de sarcome du groupe Ewing. L'expression du CD99 n'est prise en compte que s'il existe un marquage membranaire. Il faut rappeler que ce marquage membranaire n'est absolument pas spécifique des sarcomes d'Ewing et que son interprétation doit donc être intégrée aux résultats de l'étude morphologique, immunohistochimique et aux données cliniques.

Le plus souvent, ce diagnostic morphologique doit être complété par une analyse moléculaire comme nous le reverrons pour le neuroblastome et le rhabdomyosarcome. C'est bien sûr le cas pour les sarcomes du groupe Ewing dont la majorité est de localisation osseuse chez l'enfant et l'adolescent. Le sarcome d'Ewing est caractérisé par un transcrite de fusion EWS-Flt1 dans 90 % des cas et EWS-ERG dans 5 % des cas. Le diagnostic peut ainsi être confirmé par une étude en FISH de EWS ou une étude en biologie moléculaire (RT-PCR) à partir de tissu congelé. Il faut souligner que la FISH EWS montre un remaniement de EWS également dans les tumeurs desmoplasiques à cellules rondes (avec WT1 comme partenaire). Par ailleurs, le spectre des sarcomes d'Ewing est maintenant « élargi » aux tumeurs Ewing-like, isolés sur la base de l'identification

de transcrits de fusion distincts [11]. Deux groupes de tumeurs ont ainsi été individualisés ces dernières années. D'une part, les sarcomes CIC-DUX4 sont des sarcomes développés essentiellement dans les tissus mous et surtout chez l'adulte jeune. Ces tumeurs ont un aspect histologique plus atypique que les sarcomes d'Ewing et le marquage membranaire CD99 est inconstant. D'autre part, les sarcomes BCOR-CCNB3 intéressent davantage la population pédiatrique : il s'agit le plus souvent de tumeurs osseuses. La prolifération tumorale est également plus atypique que dans les sarcomes d'Ewing, avec des cellules tumorales souvent fusiformes, une architecture fasciculée, des remaniements nécrotiques et un index mitotique élevé. Le marquage membranaire CD99 est inconstant. Ces sarcomes BCOR-CCNB3 expriment en immunohistochimie la cyclineB3 qui semble représenter un marqueur spécifique de cette entité.

La mise en évidence de ces entités souligne encore davantage la nécessité de congeler les tumeurs pédiatriques et notamment les tumeurs à petites cellules rondes.

2.3. Principes généraux de prise en charge macroscopique des pièces d'exérèse chirurgicale de tumeur solide

Les pièces d'exérèse chirurgicale de tumeur solide pédiatrique, le plus souvent post-thérapeutiques, sont en grande partie gérées selon des principes communs en cancérologie. Ces pièces sont pesées, mesurées dans leurs différents axes. Des photographies macroscopiques sont constamment réalisées. Les limites d'exérèse sont encrées et les prélèvements sont repérés sur la photographie imprimée de la tumeur. L'échantillonnage est large : le prélèvement d'une tranche tumorale complète et les rapports avec les limites d'exérèse conviennent pour la plupart des pièces.

Les rapports de la tumeur avec les tissus environnants et les marges d'exérèse sont particulièrement importants dans les néphroblastomes, les hépatoblastomes et les sarcomes des tissus mous et osseux.

3. Prise en charge pathologique des principales tumeurs solides (hors tumeurs cérébrales et leucémie/lymphome)

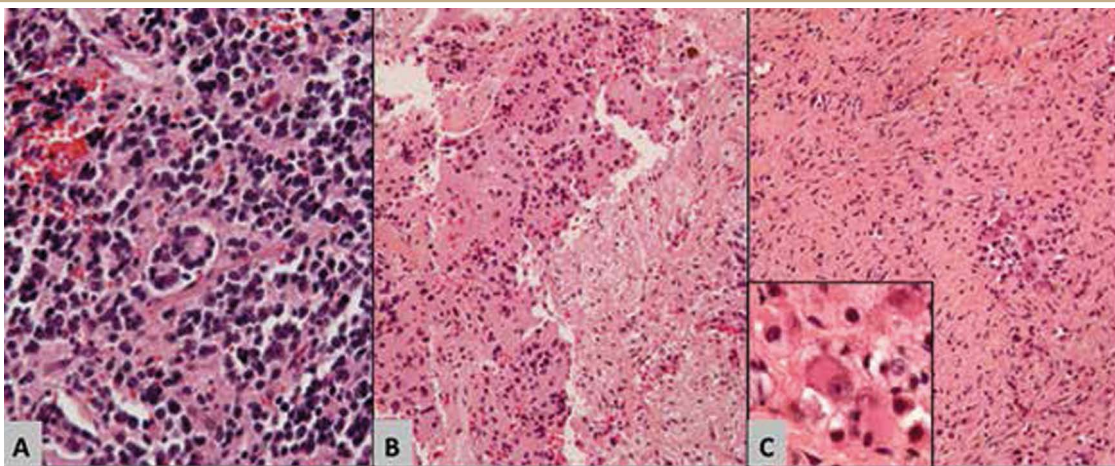
3.1. Tumeur neuroblastique périphérique/neuroblastome

Le neuroblastome (NBL) est une tumeur embryonnaire dérivée du système nerveux sympathique périphérique. Les localisations préférentielles sont la surrenale et les ganglions paraspinaux abdomino-pelviens, thoraciques et cervicaux. La présentation clinique dépend du site d'origine de la maladie, de son degré d'extension et de l'association possible à différents syndromes paranéoplasiques. La plupart des NBL sécrètent des catécholamines dont on peut mettre en évidence les métabolites dans les urines : cette étude aide au diagnostic et au suivi de la maladie. L'imagerie montre une masse renfermant typiquement des calcifications et des territoires nécrotiques et hémorragiques. Le bilan d'imagerie est capital pour préciser l'extension du NBL.

Histologiquement, une tumeur neuroblastique périphérique est constituée de cellules tumorales neuroblastiques pouvant présenter des degrés de maturation variable et d'un stroma tumoral schwannien [12]. Le pathologiste va donc confirmer le diagnostic de tumeur neuroblastique, souvent fortement suspectée sur le bilan clinique et biologique, et préciser différents éléments morphologiques à visée pronostique. Ces éléments pronostiques ne sont évalués que dans le cas d'un prélèvement réalisé avant tout traitement et n'ont aucune valeur reconnue après chimiothérapie.

Le diagnostic de tumeur neuroblastique est plus ou moins évident selon le degré de différenciation des cellules tumorales (figure 1). Lorsqu'elles sont indifférenciées ou peu différenciées, elles se présentent sous l'aspect de neuroblastes (chromatine foncée ou poivre et sel, petit nucléole inconstant, peu de cytoplasme, limites cytoplasmiques

Figure 1 - Aspect histologique des principaux sous-types histologiques de tumeur neuroblastique périphérique.



A : Neuroblastome peu différencié (cellules tumorales neuroblastiques peu différenciées sur un fond de neuropile ; à noter la présence au centre de rosettes). B : Neuroblastome différenciant (cellules tumorales majoritairement neuroblastiques, dont moins de 5 % présentent une différenciation ganglionnaire, associées à un stroma schwannien intéressant moins de la moitié de la tumeur). C : Ganglioneuroblastome mélangé (rares cellules tumorales au sein d'un abondant stroma schwannien ; présence de cellules avec différenciation ganglionnaire au sein de la composante tumorale (encart)). © Louise Galmiche

Tableau II - Classification histopronostique des tumeurs neuroblastiques périphériques selon l'INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification) en fonction de l'âge de survenue, de la différenciation tumorale et de l'index MKI.

Age	Histopronostic défavorable	Histopronostic favorable
< 18 mois	NB indifférencié NB peu différencié et MKI haut NB différenciant et MKI haut	NB peu différencié et MKI bas/intermédiaire NB différenciant et MKI bas/intermédiaire Ganglioneuroblastome mélangé Ganglioneurome
18 mois - 5 ans	NB indifférencié NB peu différencié NB différenciant et MKI intermédiaire/haut	NB différenciant et MKI bas Ganglioneuroblastome mélangé Ganglioneurome
> 5 ans	NB indifférencié NB peu différencié NB différenciant	Ganglioneuroblastome mélangé Ganglioneurome

NB : neuroblastome. MKI : index mitotique et caryorrhexique.

indistinctes). Ces neuroblastes peu différenciés présentent par ailleurs des prolongements cellulaires qui vont constituer des plages fibrillaires appelées neuropile. À l'autre extrémité du spectre, les cellules tumorales peuvent présenter une différenciation ganglionnaire complète (cytoplasme volumineux, éosinophile, noyau volumineux excentré, gros nucléole). À ces cellules tumorales peut s'ajouter un stroma de type schwannien dans les tumeurs neuroblastiques plus différenciées, constitué de cellules fusiformes, flexueuses, dont l'architecture varie selon son abondance. Enfin, ces tumeurs neuroblastiques présentent des remaniements hémorragiques, des calcifications et des infiltrats lymphoïdes. Les tumeurs neuroblastiques périphériques sont classées selon l'INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*) qui établit 4 catégories :

- le neuroblastome (stroma pauvre). Ce groupe est lui-même subdivisé en 3 catégories :
 - le neuroblastome indifférencié : il est dépourvu de neuropile et l'immunohistochimie (synaptophysine, Phox2B,...) est nécessaire pour mettre en évidence la différenciation neuroblastique des cellules tumorales (cf. paragraphe sur les tumeurs à petites cellules rondes).
 - le neuroblastome peu différencié : la tumeur comporte du neuropile, et moins de 5 % des cellules tumorales présentent une différenciation ganglionnaire.
 - le neuroblastome différenciant : au moins 5 % des cellules tumorales présentent une différenciation ganglionnaire complète (noyau arrondi de grande taille, gros nucléole, cytoplasme éosinophile représentant au moins 2 fois l'aire nucléaire). La composante schwannienne est fréquente mais inférieure à 50 % de la surface tumorale.
- le ganglioneuroblastome mélangé (stroma riche) : la composante schwannienne est supérieure à 50 % de la surface tumorale
- le ganglioneuroblastome nodulaire : cette entité est caractérisée par la présence de nodule(s) au sein de la tumeur, souvent de coloration brunâtre ou hémorragiques, correspondant à des clones tumoraux plus agressifs. Il est donc capital de bien prélever d'éventuels nodules observés macroscopiquement.
- le ganglioneurome : Sous type mûrissant : exceptionnelles cellules tumorales peu différenciées

D'autre part, sur un prélèvement histologique réalisé avant tout traitement, l'index mitotique-caryorrhexique (MKI)

doit être déterminé. Cet index est réalisé sur 5 000 cellules et le compte des mitoses et des figures de caryorrhexies permet de classer les tumeurs en NBL MKI bas (< 100/5 000 cellules), moyen (100-200/5 000 cellules) ou élevé (> 200/5 000 cellules).

L'intégration de l'âge au diagnostic, du type histologique et de l'index MKI permet de classer la tumeur en histopronostic favorable ou défavorable (*tableau II*).

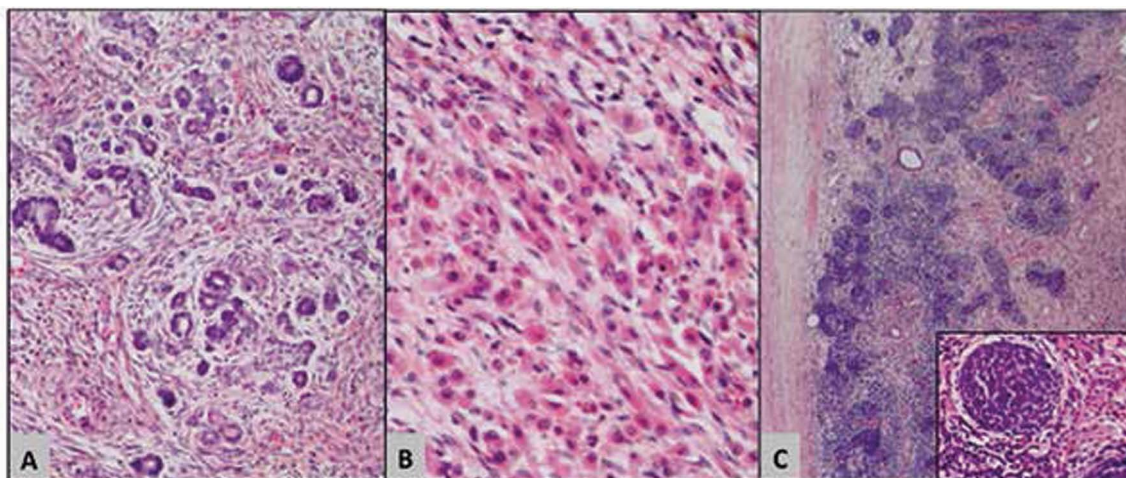
Les principaux facteurs pronostiques sont représentés par l'âge au diagnostic, le stade d'extension INSS stage (*International Neuroblastoma Staging System*) ou INRG stage (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), le groupe histopronostique INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*) et certaines altérations génomiques. Ces altérations sont représentées d'une part par l'amplification de N-Myc, facteur de mauvais pronostic. Le statut N-Myc peut être analysé en FISH sur des appositions ou des coupes congelées. D'autre part sont décrites 2 types d'anomalies génomiques : des anomalies chromosomiques segmentaires (pertes et gains de segments de chromosomes), de mauvais pronostic, et des anomalies numériques (perte et/ou gains de chromosomes entiers), de bon pronostic [13]. Du matériel congelé sert ainsi à réaliser une étude de CGH à visée pronostique. Ces éléments sont maintenant pris en compte dans les protocoles thérapeutiques pour adapter le traitement.

Des prélèvements chirurgicaux sont également réalisés après traitement, essentiellement à type de chimiothérapie. Ces exérèses visent à réduire ou enlever totalement la masse tumorale résiduelle. Seule la mention d'une tumeur neuroblastique périphérique est alors mentionnée, la classification INPC ne s'appliquant alors pas dans ce cas. Le type histologique peut néanmoins être précisé en commentaire par le pathologiste. Les marges d'exérèse peuvent être précisées lorsque cela est possible, lorsqu'il ne s'agit pas de résections fragmentées.

3.2. Néphroblastome

Le néphroblastome (NPBL) ou tumeur de Wilms est la tumeur rénale la plus fréquente chez l'enfant, survenant en général entre 1 et 5 ans. C'est une tumeur du blastème néphrogénique, le plus souvent révélée par un syndrome de masse. Un contexte génétique est présent dans 10 % des cas, le plus souvent à type de syndrome WAGR (tumeur de Wilms, Aniridie, anomalies Génito-urinaire, Retard mental), de Denys-Drash (sclérose mésentérique diffuse, anomalies

Figure 2 - Différentes composantes couramment rencontrées dans les néphroblastomes.



A : composante épithéliale sous forme de tubes associée à une composante stromale sous forme de cellules mésenchymateuses fusiformes. C : composante stromale à type de rhabdomyoblastes dans un néphroblastome après chimiothérapie. D : composante blastématique associant des cellules de type « petites cellules bleues » et des cellules plus fusiformes (encart). © Louise Galmiche

du développement sexuel), de Wiedmann Beckwith (hémihypertrophie, macroglossie, omphalocèle, viscéromégalie). Une biopsie diagnostique échoguidée à l'aiguille peut être réalisée, à la condition qu'elle soit faite avec une aiguille fine (au moins 18 gauges). Une biopsie avec une aiguille plus volumineuse ou une biopsie chirurgicale sont formellement contre-indiquées et font passer la tumeur en stade III d'emblée. Toutefois, entre 6 mois et 6 ans, le diagnostic de néphroblastome est souvent porté de façon présomptive. Au cours du bilan initial, le bilan d'extension locorégional (veine rénale, ganglions) et général est particulièrement important. Une chimiothérapie préopératoire (protocole de la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOPE) associant actinomycine-D et vincristine permet une réduction tumorale préopératoire (souvent rapide et importante) ce qui facilite la chirurgie et aide à détruire des (micro)métastases. Une néphrectomie post-chimiothérapie est ensuite réalisée. Une néphrectomie primitive est réalisée avant 6 mois car la probabilité qu'il s'agisse d'un néphrome mésoblastique et non d'un NPBL est importante. Chez les grands enfants, la néphrectomie d'emblée est justifiée par la forte suspicion de carcinome.

Le rôle de l'anatomopathologiste est central dans la prise en charge du NPBL. L'examen macroscopique et microscopique de la pièce permet de préciser le grade et le stade de la tumeur [14, 15]. Pour cela, une tranche tumorale totale est réalisée, après encrage de la pièce, dans le grand axe de la pièce passant par le hile (plan frontal) ainsi que des recoupes perpendiculaires à cette tranche (plan transversal). Il est particulièrement important d'examiner et prélever le hile, la veine rénale à la recherche d'une thrombose, la graisse périrénale et les marges d'exérèse.

Par ailleurs, des prélèvements congelés multiples sont réalisés sur la tumeur et le rein non tumoral. La fixation d'un fragment de rein non tumoral en AFA peut être utile pour avoir une bonne appréciation morphologique de son architecture, en particulier des glomérules.

Le grade est déterminé sur l'examen de la tranche tumorale totale. Il dépend des composantes histologiques observées, de leur abondance et de l'abondance des

remaniements post-chimiothérapie (nécrose, hémorragie, pseudokystes, macrophages xanthélasés, fibrose). Il est important de noter que le grade dépend aussi de la réalisation ou non d'une chimiothérapie préopératoire : en effet, cette chimiothérapie protocolaire en Europe n'est pas systématique en Amérique du Nord où la chirurgie 1^{re} est davantage la règle.

Le NPBL peut associer en quantités très variables les composantes suivantes (figure 2) : épithéliale (sous forme de tubes et de glomérules), mésenchymateuse ou stromale (cellules fusiformes, différenciation rhabdomyoblastique ou autre) et blastématique (cellules indifférenciées ressemblant au blastème embryonnaire). Les cellules blastématiques sont petites, rondes, parfois un peu allongées, entassées. Leurs noyaux sont ovoïdes et basophiles, avec une chromatine fine parfois discrètement nucléolée. Le cytoplasme est peu abondant. L'activité mitotique est importante. Ces cellules forment des plages diffuses, faites de cellules peu cohésives, ou forment des cordons, des travées et des nodules. Ces différentes composantes peuvent être associées de façon très variable, notamment au sein d'une même tumeur en différentes zones. Elles doivent être quantifiées en pourcentage de la surface tumorale sur la tranche totale. Leur proportion relative détermine la classification du néphroblastome en type de bas risque, risque intermédiaire ou haut risque (tableau III). On recherche également des signes d'anaplasie, en précisant son caractère focal ou diffus. L'anaplasie est définie par des noyaux volumineux (diamètre $\times 3$ celui des noyaux voisins du même type cellulaire), un hyperchromatisme de ces gros noyaux et la présence de mitoses multipolaires (chaque bras de la mitose est plus grand qu'une métaphase habituelle) [16]. La présence de plus de 2/3 de remaniements post-chimiothérapie sur la tranche tumorale totale détermine un sous-type régressif. De même, le sous-type épithélial est défini par la prépondérance de la composante épithéliale, représentant plus des 2/3 de la surface tumorale, de même pour le sous-type stromal et le sous-type blastématique. La présence de restes néphrogéniques RN est également recherchée sur la pièce d'exérèse [17].

Ces RN correspondent à la persistance de tissu néphrogénique non tumoral. Lorsqu'ils sont multiples dans le rein, on parle de néphroblastomatose. Ces RN sont considérés comme des précurseurs des NPBL et sont retrouvés dans 30 à 40 % des néphrectomies pour NPBL. On distingue les RN périlobaires (RNPL) des RN intralobaires (RNIL). Les RNPL sont développés en périphérie des lobes (en référence à la lobulation rénale fœtale), sont bien limités et peuvent comporter des éléments blastémateux, épithéliaux et de la fibrose. Ils sont volontiers multiples. Les RNIL sont développés dans le lobe, sont souvent moins bien délimités, de contours volontiers irréguliers, à prédominance stromale. Ces RNIL sont volontiers uniques. Les RN sont, dans l'ensemble, peu ou pas chimiosensibles. L'estimation de l'extension locorégionale est particulièrement importante pour la suite de la prise en charge (**tableau IV**). La plupart des néphroblastomes sont classés en stades I, II ou III. Les éléments les plus souvent discutés pour la stadification sont le statut du hile et des marges d'exérèse (**figure 3**).

Dans le stade I, la tumeur reste limitée au rein, encapsulée et d'exérèse complète. Ainsi, on classe en stade I un NPBL avec probable extension extra-rénale mais constitution d'une néocapsule fibreuse entourant la tumeur et la séparant de la graisse périrénale et des tissus environnants. Un NPBL peut être classé en stade I même en présence d'adhérence de la pièce à d'autres organes (diaphragme, foie,...) mais présence d'un plan fibreux entre la tumeur et l'organe accolé.

Dans le stade II, il existe une extension extra-rénale. Le problème le plus récurrent pour le pathologiste est celui de l'envahissement du hile. L'invasion des vaisseaux du hile est définie par la présence de tumeur viable dans la lumière vasculaire, parfois avec invasion de la paroi vasculaire. Dans ce cas, il est important d'examiner la recoupe de la veine rénale, soit adressée à part par le chirurgien, soit réalisée par le pathologiste sur la pièce.

Dans le stade III sont compris les néphroblastomes avec métastases dans les ganglions du hile. L'examen des ganglions

Tableau III : Classification des tumeurs rénales pédiatriques de la SIOP (Society of Paediatric Oncology).

I - Tumeurs de bas risque (favorable)

- Néphroblastome kystique partiellement différencié
- Néphroblastome complètement nécrotique après chimiothérapie pré-opératoire
- Néphrome mésoblastique
- Tumeur stromale métanéphrique

II - Tumeurs de risque intermédiaire (standard)

- Néphroblastome de type régressif, mais avec persistance de tumeur viable (> 2/3 nécrose et < 100%)
- Néphroblastome mixte ou à prédominance épithéliale ou stromale (2/3 nécrose)
- Néphroblastome avec anaplasie focale

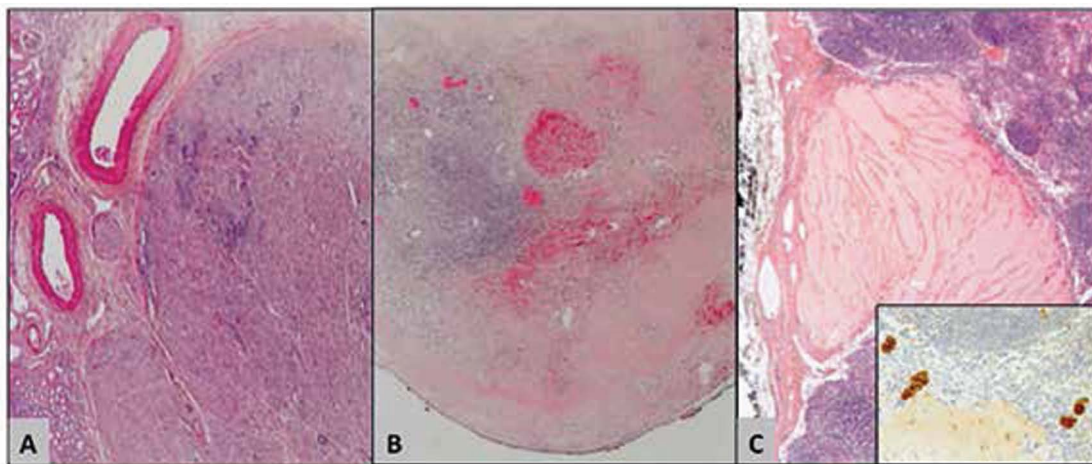
III - Tumeurs de haut risque

- Néphroblastome avec anaplasie diffuse
- Néphroblastome blastémateux après chimiothérapie
- Sarcome à cellules claires du rein
- Tumeur rhabdoïde du rein

Tableau IV : Stades des néphroblastomes

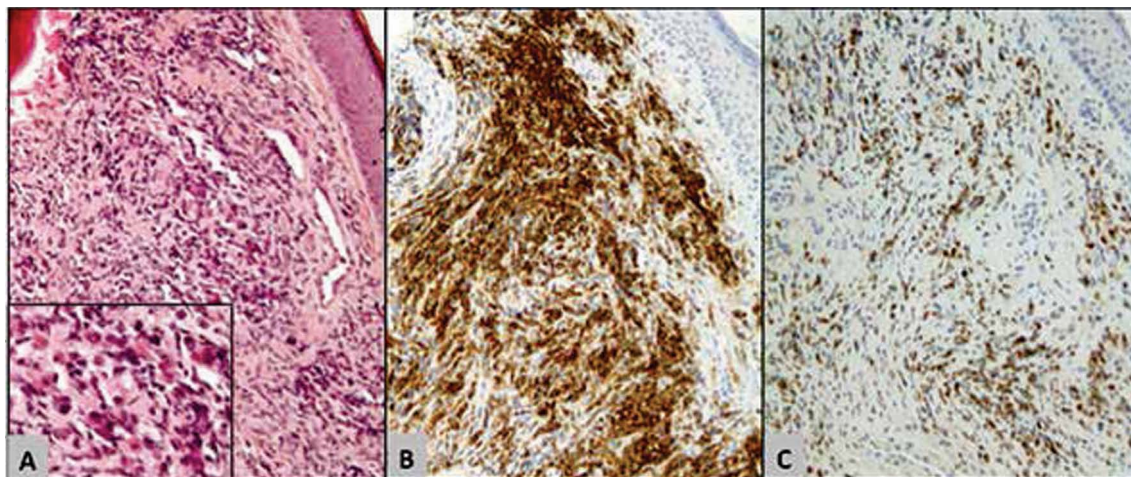
Stade I :	tumeur limitée au rein, encapsulée, d'exérèse complète. - invasion partielle de la capsule n'atteignant pas la surface encrée - Protrusion possible dans les cavités urinaires (exérèse complète) - Tumeur nécrosée possible dans le sinus ou la graisse - Vaisseaux intra rénaux peuvent être envahis
Stade II :	tumeur franchissant la capsule rénale mais dont l'exérèse a été totale. - IIa : graisse péri rénale, sinus, adhésion - IIb : sinus rénal et/ou vaisseaux sanguins ou lymphatiques extra-rénaux - IIc : organes adjacents ou veine cave
Stade III :	exérèse incomplète ou tumeur rompue (par traumatisme, biopsie) ou ganglions du hile rénal envahis
Stade IV :	métastases hématogènes ou ganglionnaires hors région abdominopelvienne.
Stade V :	néphroblastome bilatéral synchrone

Figure 3 - Situations relatives à la stadification des néphroblastomes.



A : invasion de vaisseaux du hile rénal par de la tumeur viable (stade II). B : présence de tumeur viable au niveau de la recoupe chirurgicale de la veine rénale (stade III). C : présence de protéine de Tamm-Horsfall dans les sinus des ganglions hilaires rénaux, parfois associée à quelques tubes (exprimant les cytokératines AE1-AE3 en encart), pouvant être confondue avec une métastase ganglionnaire. © Louise Galmiche

Figure 4 - Rhabdomyosarcome embryonnaire du conduit auditif.



A : prolifération tumorale de densité cellulaire variable selon les territoires avec présence de quelques cellules tumorales présentant une nette différenciation rhabdomyoblastique sous forme d'un abondant cytoplasme éosinophile et un noyau déjeté à un pôle (encart). B : marquage des cellules tumorales par la desmine. C : marquage nucléaire d'environ 2/3 des cellules tumorales par la myogénine. © Louise Galmiche

peut présenter un aspect trompeur : la présence de protéine de Tamm-Horsfall, voire de cellules épithéliales isolées ou formant des structures tubulaires, dans les sinus ganglionnaires ne doivent pas être pris pour des métastases. De même, des cellules urothéliales et des inclusions mésothéliales ont également été rapportées [18].

Le site des métastases est surtout représenté par le poumon puis par le foie et l'os. Classer un NPBL en stade III ou IV conduit à la réalisation d'une radiothérapie.

La guérison est obtenue dans 90 % des cas. Elle est quasiment certaine après 2 ans. La survenue de métastases ou d'une récurrence locale est généralement observée dans les NPBL de stade III et en cas d'histologie défavorable.

3.3. Rhabdomyosarcomes

Le rhabdomyosarcome (RMS) représente, en fréquence, le 1^{er} sarcome des tissus mous pédiatrique. Le diagnostic reste basé sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie de la lésion. Des anomalies génétiques sont décrites associées au RMS. Parmi elles, on peut citer le syndrome de Beckwith-Wiedemann (délétions et LOH en 11p15), le syndrome de Gorlin ou naevomatose basocellulaire (mutation de PTCH), le syndrome de Costello (mutation de H-RAS), la neurofibromatose de type 1 (mutation de NF1) ou le syndrome de Li-Fraumeni (mutation de TP53).

Deux principaux types histologiques de RMS sont décrits : les RMS embryonnaires et les RMS alvéolaires [19]. Ces 2 entités se distinguent également par différents critères cliniques.

Les RMS alvéolaires peuvent ainsi survenir à tout âge mais c'est la forme histologique prépondérante après 5 ans. Les RMS embryonnaires surviennent, eux, surtout avant 5 ans. La localisation des RMS varie également selon le sous-type. Les RMS embryonnaires se développent en région cervicale (orbite, joue, bouche, pharynx, oreille, fosse temporale, région parotidienne), abdominale (tissus mous, canaux biliaires intra et extrahépatiques, vésicule biliaire), génitourinaire (vessie, prostate, vagin, col utérin, utérus) et

scrotale (tissus mous paratesticulaires). Les RMS alvéolaires sont observés au niveau des extrémités (mains, cuisse, mollet, pied), du tronc (muscles fessiers, région périnéale, paroi thoracique et abdominale, muscles paraspinaux) et de la région cervicale (sinus paranasaux, base du crâne). Typiquement, l'aspect histologique est différent [20]. Les RMS embryonnaires (figure 4) comportent des zones de densité cellulaire variable, tantôt paucicellulaires, lâches et myxoides, tantôt densément cellulaires. Les cellules tumorales elles-mêmes présentent des degrés de différenciation très variables d'une tumeur à l'autre et au sein d'une même tumeur, pouvant récapituler les différents stades de la myogénèse. Ainsi, on peut observer un aspect de tumeur à cellules rondes et/ou des cellules rhabdomyoblastiques au cytoplasme éosinophile abondant.

Les RMS alvéolaires (figure 5) sont constitués de plages cellulaires peu cohésives formant des nids séparés les uns des autres par des septa fibreux. L'architecture alvéolaire est ainsi artéfactuelle du fait d'une rétraction tissulaire différente de la composante cellulaire et stromale. Les cellules tumorales sont volontiers rondes et monomorphes et ne présentent souvent pas de différenciation rhabdomyoblastique. Cette architecture alvéolaire est absente dans la variante solide, dont l'aspect est celui d'une tumeur à cellules rondes basophiles.

Cette distinction apparemment nette entre ces 2 sous-types est parfois délicate : un RMS embryonnaire peut se présenter comme une tumeur à cellules rondes d'architecture alvéolaire, posant la question d'un RMS alvéolaire. L'étude immunohistochimique est déterminante dans le diagnostic. Les RMS expriment la desmine (expression cytoplasmique le plus souvent diffuse quel que soit le sous-type histologique) et la myogénine (expression nucléaire). L'expression de la myogénine diffère entre les sous-types et constitue un bon élément de classification histologique : le marquage est diffus dans les RMS alvéolaires (entre 80 et 100 % des cellules tumorales) et est beaucoup plus hétérogène dans les RMS embryonnaires, intéressant en général moins de 2/3 des cellules.

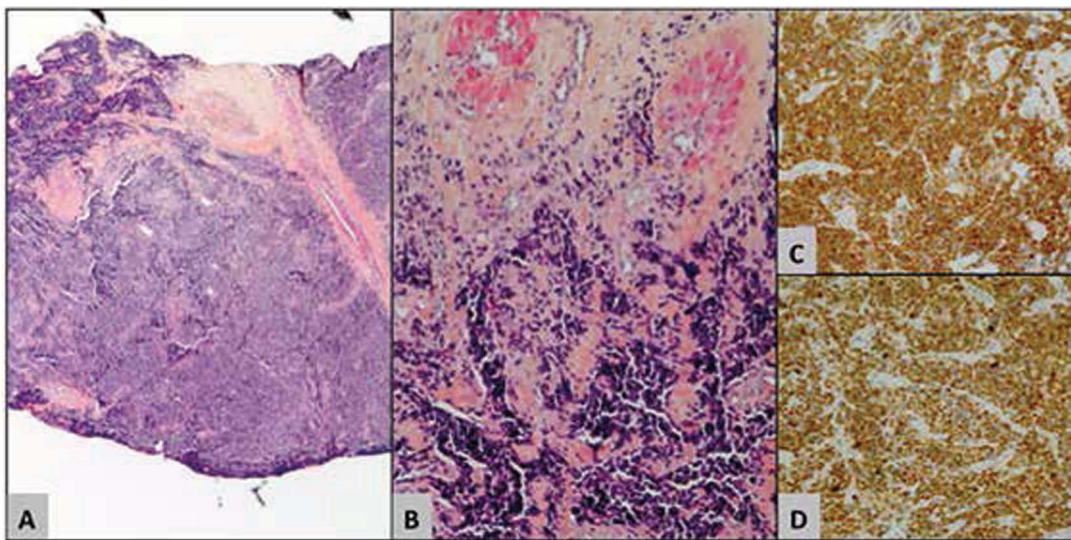
D'autres types histologiques sont décrits. Parmi eux, le RMS botryoïde est un variant de RMS embryonnaire et survient dans des organes creux (vagin, vessie, tractus biliaire). La prolifération tumorale réalise des formations polypoides « en grappe ». Histologiquement, ce sous-type est défini par la présence d'une couche cambiale, correspondant à une densification cellulaire sous l'épithélium de surface. Le RMS à cellules fusiformes est également assimilé aux RMS embryonnaires. La plupart se développent en région paratesticulaire et orbitaire. La prolifération est faite de faisceaux de cellules fusiformes, d'agencement storiforme, au sein d'un stroma collagène d'abondance variable. Une autre variante, le RMS sclérosant, peut présenter des aspects communs avec le RMS à cellules fusiformes.

Le rôle de la biologie moléculaire, en complément de l'anatomopathologie, est très important dans le diagnostic de RMS. Le RMS alvéolaire est caractérisé par la présence d'un transcrite de fusion PAX3-FOXO1 ou PAX7-FOXO1.

Le diagnostic de RMS alvéolaire doit ainsi être confirmé par la mise en évidence, soit du remaniement de FOXO1 en FISH soit de l'un des transcrits de fusion en biologie moléculaire. Le pronostic des RMS alvéolaire sans transcrite semble se rapprocher des RMS embryonnaires, ce qui conduit de plus en plus à ne considérer comme RMS alvéolaire que les tumeurs avec transcrite, en particulier lors de l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques.

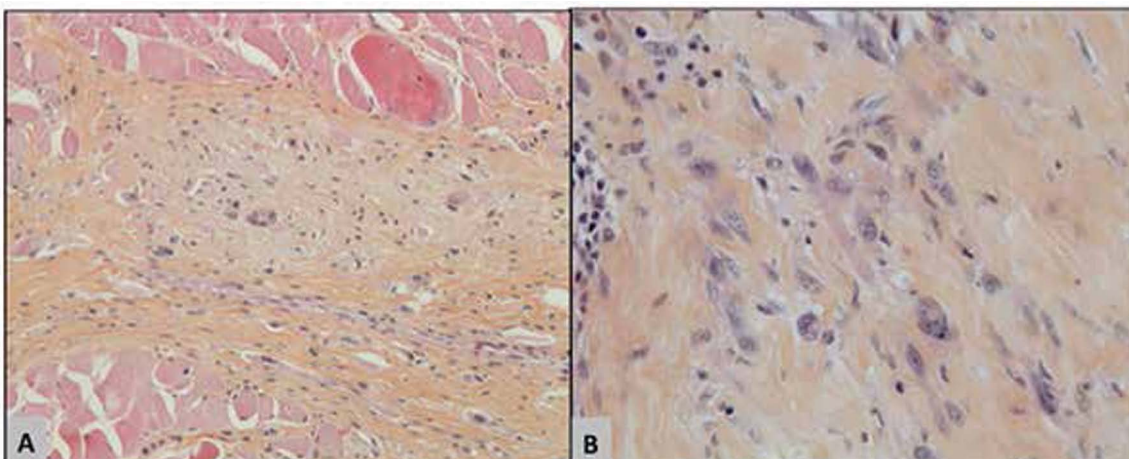
D'autre part, l'identification de nouvelles anomalies moléculaires ont été plus récemment identifiées, plus souvent retrouvées dans les variantes à cellules fusiformes et sclérosantes. Des remaniements des gènes VGLL2 et NCOA1 ont été identifiés dans des RMS congénitaux et du nourrisson ou avant 1 an, et associés à un pronostic très favorable [21]. À l'inverse, des mutations de MyoD1 ont été identifiées dans des RMS survenant chez les enfants plus âgés (moyenne d'âge de 10 ans), comme dans des RMS

Figure 5 - Rhabdomyosarcome alvéolaire du sillon naso-génien.



A et B : prolifération tumorale d'architecture solide (A) ou alvéolaire (B). C et D : marquage de la totalité des cellules tumorales par la desmine (C) et la myogénine (D).
© Louise Galmiche

Figure 6 - Résection chirurgicale post-chimiothérapie d'un rhabdomyosarcome alvéolaire.



A : présence de larges zones de remaniements fibreux au sein desquelles on distingue des cellules volumineuses et atypiques. B : A plus fort grossissement, les cellules tumorales viables résiduelles associent des cellules aux atypies nucléaires marquées et des cellules avec une différenciation rhabdomyoblastique nette.
© Louise Galmiche

de l'adulte, et associées à un pronostic défavorable [22]. Les RMS sont traités par chimiothérapie néoadjuvante parfois associée à une radiothérapie. Le pathologiste est ainsi confronté à des pièces d'exérèse du résidu tumoral. Il doit alors identifier la présence de cellules tumorales viables résiduelles (**figure 6**) et préciser les marges d'exérèse de la pièce. Il peut être particulièrement délicat de distinguer des rhabdomyoblastes tumoraux de fibres musculaires dystrophiques enserrées dans la fibrose et les remaniements post-thérapeutiques. Il est important de noter que l'aspect de la prolifération est parfois très différent au stade pré et post-thérapeutique, souvent dans le sens d'une différenciation musculaire striée des cellules tumorales après chimiothérapie. Enfin, l'immunomarquage par la desmine et la myogénine représente également une aide, à condition de bien étudier en parallèle la morphologie des cellules marquées par ces anticorps : en effet des fibres musculaires régénératives, non tumorales, peuvent exprimer la myogénine. Il est alors particulièrement important de rechercher des atypies nucléaires parmi les cellules exprimant la myogénine.

4. Conclusion

Les cancers de l'enfant sont rares et constitués d'entités très hétérogènes selon leur site d'origine, leur histologie, leur biologie et leur pronostic. Les 3 entités,

dont la prise en charge anatomopathologique est illustrée, ici rendent compte de cette diversité. La place du pathologiste y est partout centrale tant en ce qui concerne le diagnostic que la précision de critères histoprognostiques. Le pathologiste est également le pivot entre l'analyse morphologique et l'étude moléculaire, le plus souvent indispensable, venant tantôt confirmer le diagnostic histologique, tantôt apporter des éléments pronostiques ou guidant le traitement. Il lui appartient de gérer au mieux le matériel qui lui est adressé.

De gros progrès thérapeutiques ont été réalisés et l'heure est aujourd'hui à la désescalade thérapeutique afin de diminuer les effets secondaires des traitements. D'autre part, une faible proportion d'enfants atteints décède encore de leur tumeur ou des conséquences du traitement. Ces données justifient pleinement la poursuite d'études biologiques au sein desquelles l'analyse histologique a toute sa place, combinée à des études moléculaires de plus en plus performantes (séquençage pangénomique, de l'exome, des ARN,...). Ceci vient souligner l'importance d'une expertise suffisante de la pathologie pédiatrique pour la gestion de ces tumeurs du fait de leur rareté et de problématiques spécifiques à l'enfant.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Lacour B, Clavel J. Epidemiological aspects of childhood cancer. *Rev Prat.* 2014 Nov ; 64(9) : 1264-9.
- [2] Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, et al. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev.* 2010; 19:173-181.
- [3] Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Crocetti E, et al. Time trends of cancer incidence in European children (1978-1997) : Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer* 42 (2006) 1961-1971.
- [4] Linabery AM, Ross JA. Trends in Childhood Cancer Incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* 2008 ; 112 : 416-32.
- [5] Desandes E, Clavel J, Berger C, et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatric Blood and Cancer* 2004 (43): 749-757.
- [6] Orbach D, Sarnacki S, Brisse HJ, et al. Neonatal cancer. *Lancet Oncol* 2013 ; 14: e609-20.
- [7] Lacour B, Goujon S, Guissou S, et al. Childhood cancer survival in France, 2000-2008. *Eur J Cancer Prev.* 2014 Sep ; 23(5) : 449-57
- [8] Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D. Les prédispositions génétiques aux cancers de l'enfant en 2011. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 459-475.
- [9] Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Dec 10 ; 373(24): 2336-46.
- [10] Bourdeaut F, Sarnacki S. Tumor and development (TED): A national survey to register associations of pediatric cancer and congenital malformations. *Revue d'Oncologie Hématologie Pédiatrique.* Volume 2, Issue 2, June 2014, Pages 70-77.
- [11] Renard C, Ranchère-Vince D. Ewing/PNET sarcoma family of tumors: towards a new paradigm ? *Ann Pathol.* 2015 Jan ; 35(1): 86-97.
- [12] Peuchmaur M. Peripheral neuroblastic tumors: anatomopathological classification. *Ann Pathol.* 2004 Dec ; 24(6) : 556-67.
- [13] Normand C, Michon J, Janoueix-Lerosey I, et al. Les altérations génétiques dans le neuroblastome et leur apport pour la prise en charge thérapeutique. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 477-488.
- [14] Perlman E, Boccon-Gibod L. Kidney tumors in childhood. *Ann Pathol.* 2004 Dec ; 24(6) : 516-35.
- [15] Popov SD, Sebire NJ, Vujanic GM. Wilms' Tumor - Histology and Differential Diagnosis. In: van den Heuvel-Eibrink MM, editor. *Wilms Tumor.* Brisbane (AU): Codon Publications ; 2016 Mar. Chapter 1.
- [16] Zuppan CW, Beckwith JB, Luckey DW. Anaplasia in unilateral Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Hum Pathol* 1988 ; 19(10) : 1199-1209.
- [17] Perlman E, Dijoud F, Boccon-Gibod L. Nephrogenic rests and nephroblastomatosis. *Ann Pathol.* 2004 Dec ; 24(6) : 510-5.
- [18] Weeks DA, Beckwith JB, Mierau GW. Benign nodal lesions mimicking metastases from pediatric renal neoplasms: a report of the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Hum Pathol.* 1990 Dec ; 21(12):1239-44.
- [19] Parham DM, Alaggio R, Coffin CM. Myogenic Tumors in Children and Adolescents. *Pediatr Dev Pathol.* 15 (1) Supplement, 211-238, 2012
- [20] Picarsic J, Reyes-Múgica M. Phenotype and immunophenotype of the most common pediatric tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015 May-Jun ; 23(5):313-26.
- [21] Alaggio R, Zhang L, Sung YS, et al. A Molecular Study of Pediatric Spindle and Sclerosing Rhabdomyosarcoma: Identification of Novel and Recurrent VGLL2-related Fusions in Infantile Cases. *Am J Surg Pathol.* 2016 Feb ; 40(2) : 224-35.
- [22] Agaram NP, Chen CL, Zhang L, et al. Recurrent MYOD1 mutations in pediatric and adult sclerosing and spindle cell rhabdomyosarcomas: evidence for a common pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014 Sep ; 53(9):779-87.

Étude historique de la visualisation des protéines

De la représentation ancienne de « noyau organique azoté » du XIX^e siècle à la vision statique en « boules-tiges de fer » des années cinquante aux méthodes actuelles de modélisation en dynamique moléculaire

Jean-Frédéric Bruch^{a,*}, Loïc Metairy^b, Myriam El Gani^a, Arthur Pearson^b, Thibault Kervarrec^c, Flore Tabareau-Delalande^d, Junior Samuel López Yépez^e

RÉSUMÉ

L'histoire de la visualisation des protéines est inséparable de celle de la biologie structurale qui étudie la structure et l'organisation spatiale des macromolécules biologiques. Les anciens avaient initialement imaginé les protéines comme des noyaux organiques azotés entourés d'une copule minérale. La détermination à l'échelle atomique de la structure 3D des protéines fait appel à des techniques d'approche biophysiques élaborées dans la première moitié du vingtième siècle. La cristallographie par diffraction des rayons X permet d'obtenir une carte de densité électronique. La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) définit une carte des distances inter-protons et des angles de torsion du squelette de la protéine. La cryomicroscopie électronique donne une image directe de la molécule saisie dans son milieu aqueux. Ces trois familles de techniques évoluent de manière spectaculaire pour grandir en précision, en définition et en analyse spatiale et temporelle. Aujourd'hui ces méthodes convergent grâce à des bases de données interactives et des outils bioinformatiques de modélisation dynamique vers la définition de modèles de liaisons « protéines-ligands », la découverte d'inhibiteurs pharmacologiques, la prédiction de structure macromoléculaire et une compréhension accrue des maladies du repliement anormal des protéines.

**Bases de données - cryomicroscopie électronique -
diffraction des rayons X - dynamique moléculaire - magnétique nucléaire -
maladies du repliement - modélisation moléculaire -
repliement des protéines - spectroscopie par résonance.**

a Service de Pathologie

Centre Hospitalier Louis Pasteur
4 rue Claude Bernard 28630 Le Coudray

b Service d'Imagerie,

Centre Hospitalier de Blois, 41016, Blois Cedex

c Service d'Anatomie-cytologie Pathologique

CHRU de Tours 37044 Tours cedex 9

d Service de Pathologie

Centre Hospitalier régional d'Orléans
1 Porte Madeleine, 45032 Orléans, France

e Department of Chemistry

Langelandsgade 140 8000 Aarhus C Denmark

* Correspondance

jfbruch@ch-chartres.fr

article reçu le 15 octobre 2016, accepté le 31 octobre 2016.

© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

Historic study of the display of proteins

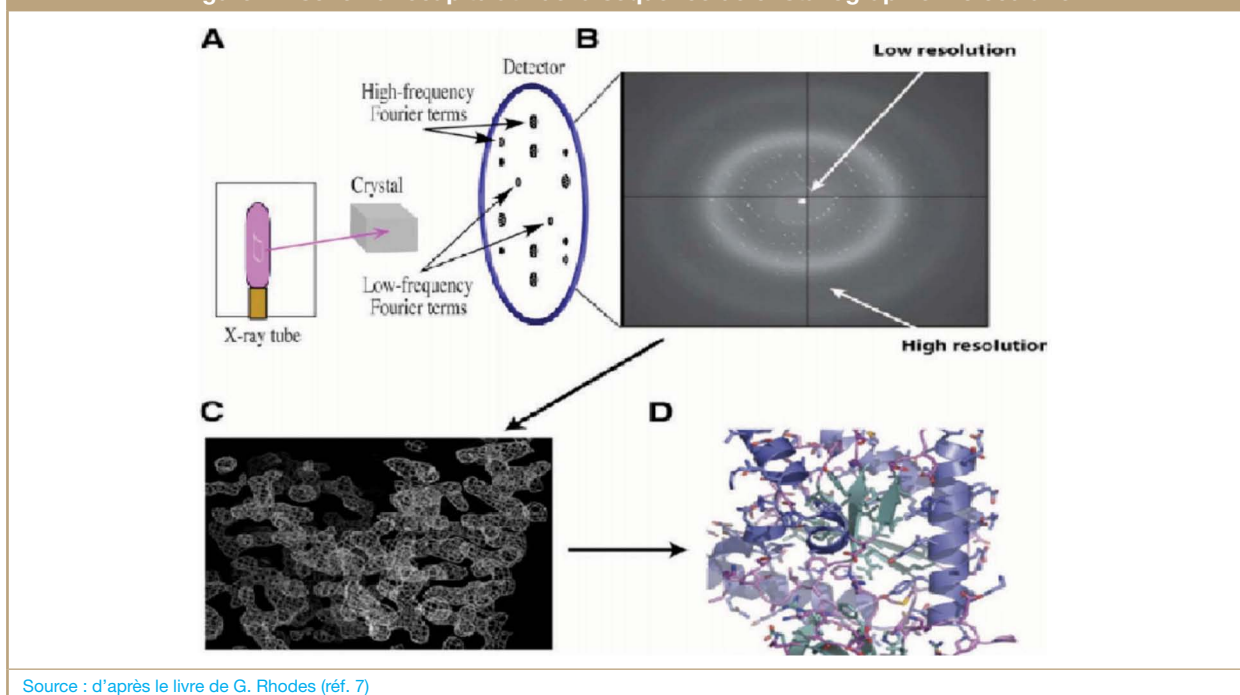
The history of the visualization of proteins is inseparable from that of structural biology that studies the structure and spatial organization of biological macromolecules. The ancients had initially imagined proteins as organic nitrogen nuclei surrounded by a mineral copula. The determination at the atomic scale of the 3D structure of proteins uses biophysical approach techniques developed in the first half of the twentieth century. Crystallography by X-ray diffraction provides an electron density map. Nuclear magnetic resonance spectroscopy defines a map inter-proton distances and angles of torsion of the backbone of the protein. Electron cryomicroscopy gives a direct image of the input molecule in its aqueous medium. These three families of techniques are evolving dramatically to grow in accuracy, resolution and spatial and temporal analysis. Today these methods converge with interactive databases and dynamic modeling bioinformatics tools towards defining models of «protein ligands» bounds, the discovery of pharmacological inhibitors, the prediction of macromolecular structure and an increased understanding of folding diseases abnormal proteins.

**X ray diffraction - Cryoelectron microscopy -
NMR - Protein folding**

1. Introduction

Retracer l'histoire de la visualisation moléculaire des protéines nécessite de nous repositionner dans le temps en fonction des différents événements qui ont jalonné l'histoire des sciences de la chimie, de la physique et de la biologie des protéines. « Voir » n'est pas toujours « comprendre » et un cadre de pensée est nécessaire à la compréhension éclairée des images moléculaires, qu'elles soient destinées à la recherche, à l'enseignement ou à la vulgarisation.

Figure 1 – schéma récapitulatif de la séquence de cristallographie moléculaire.



Source : d'après le livre de G. Rhodes (réf. 7)

Nous étudierons différentes périodes pour en extraire les principaux paradigmes et suivre pas à pas l'évolution des idées, des découvertes et des faits en fonction du contexte de chaque époque.

2. Courant dix-neuvième siècle : les premières notions

La notion de protéine est apparue en 1838 sous l'impulsion du chimiste néerlandais Gerhardus Johannes Mulder pour désigner un ensemble de substances végétales ou animales douées de propriétés nutritives et dont l'analyse élémentaire montrait à peu près la même formule empirique en carbone, hydrogène, azote et oxygène selon une règle de proportionnalité. (400/620/100/120). Ce noyau organique serait entouré d'une « copule » minérale formée d'atomes de soufre et de phosphore individuels [1]. Une copule est un composé imaginaire dont la présence déguise toutes les propriétés chimiques des corps auxquels il est uni. Durant le XIX^e siècle une douzaine d'acides aminés seront isolés et identifiés notamment par Vauquelin et Robiquet, Liebig puis caractérisés structuralement au siècle suivant. En 1894 un chimiste allemand Emil Fischer propose un paradigme d'interaction entre les protéines enzymatiques et les substances dont elles catalysent la formation selon un modèle clé (molécule transformée) et serrure (enzyme). Fischer parvient à établir le type de liaison chimique qui connecte les acides aminés entre eux pour former des chaînes : la liaison peptidique ce qui lui vaudra l'obtention du prix Nobel de chimie en 1902.

La vision des protéines dans les années vingt était celle d'une sphère, pour les protéines dites globulaires et des filaments pour les protéines fibreuses[2].

3. Années 1890-1950 : les découvertes essentielles en physique qui vont poser les bases de l'étude des structures macromoléculaires

3.1. Années 1890-1950 : cristallographie rayons X

En 1895 Wilhelm Roentgen découvre un soir d'hiver, en actionnant un tube cathodique enveloppé dans un carton rigide que de mystérieux rayons invisibles traversent le carton et viennent impressionner un écran. [3]. Cette découverte des rayons dénommés « X » vaut à son auteur l'attribution du premier prix Nobel de physique en 1901. Parallèlement deux chimistes réputés Franz Hofmeister et Emil Fischer proposent en 1897 indépendamment et simultanément que les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques [2]. En 1912 X Max von Laue découvre que les rayons X sont diffractés par des cristaux et suspecte que la longueur d'onde du rayon X pourrait être comparable à la distance inter-atomique. William Bragg et son fils Willie établissent en 1913-1915 les bases physiques du phénomène de diffraction des rayons X, par analogie avec la diffraction de la lumière dans un réseau de diffraction de microscope optique, en notant que les feuilles d'atomes jouent le rôle de plans de réflexion pour les rayons X.

Willie Bragg formule en 1913 une loi mathématique définissant les conditions nécessaires pour produire une diffraction effective de rayons X à travers un cristal moléculaire dont les feuillettes sont séparés d'une distance « d ». La formule $\{2 \sin \theta \times d = l \times n\}$ exprime la condition

pour laquelle un maximum d'interférences survient arrivant par sommations successive à produire des rayons suffisamment intenses pour produire une tâche visible sur un écran. Cette formule indique que deux rayons incidents en phase, touchant chacun un plan du cristal, suivant une orientation appropriée d'angle « alpha » suivent un chemin dont la différence de longueur est égale au produit de la longueur d'onde du rayon X par un nombre entier. Laue et les deux Braggs (père et fils) seront nobélisés respectivement en 1914 et 1915 [3].

Le cristal diffracte la source de rayons X en une multitude de rayons produisant chacun une tâche sur le film radiographique. Les ondes diffractées sont la transformée de Fourier des objets moléculaires agencés dans l'unité cellulaire du cristal. La position et l'intensité des tâches de diffraction contiennent les informations nécessaires pour déterminer la structure moléculaire. L'intensité de la tâche est fonction de l'amplitude du rayon diffracté. La position de la tâche permet de déduire la direction du rayon dans un système de coordonnées 3D des plans de diffraction (h,k,l) de l'espace dit « réciproque ». L'image moléculaire est redessinée dans l'espace « réel » à partir d'une carte de contours de densité électronique (coordonnées x,y,z) obtenue à partir de la transformée de Fourier inverse de chaque rayon diffracté (figure 1).

En 1926 le chimiste James Summer découvre la cristallisation du premier enzyme : l'uréase (prix Nobel de chimie en 1946). Dorothy Crowfoot Hodgkin travaillait avec J. Desmond Bernal (dénommé « le Sage ») sur la cristallisation des protéines et publia en 1934 les premières images de diffraction protéique à partir de cristaux de pepsine.

La mathématicienne britannique Dorothy Wrinch formule en 1936 une théorie imaginaire dite des « cyclols » selon laquelle la chaîne d'acide aminé se replie selon une figure géométrique cyclique reproductible quasiment à l'infini. Cette théorie fut rapidement invalidée par Linus Pauling en tant que contredisant les lois élémentaires de la chimie. Dorothy Crowfoot Hodgkin poursuit ses travaux de diffraction moléculaire (cholestérol, pénicilline) sans pouvoir élucider la structure cristallographique des protéines.

Le chaînon manquant était que les structures ne pouvaient pas être résolues avec précision en raison d'un problème de phase inconnue ne permettant pas de recalculer l'ensemble des ondes diffractées au sein de chaque unité cellulaire [4-5-6-7].

3.2. RMN : années 1890-1950

Le physicien Wolfgang Pauli décrit dès 1924 une propriété magnétique du noyau atomique : en tournant sur lui-même le noyau chargé positivement crée un champ magnétique selon la loi de Faraday appliquée à un atome : ce phénomène caractérise le spin nucléaire magnétique. Plus tard le physicien américain Isidore Isaac Rabi montre en 1938 un premier exemple de résonance magnétique nucléaire (RMN).

La RMN va prendre ses lettres de noblesse à la fin de la deuxième guerre mondiale, les américains F. Bloch et E. Purcell décrivent indépendamment chacun dans son laboratoire, le phénomène de résonance et de relaxation. Ils obtiendront le prix Nobel de physique en 1952. [8]

4. Les années cinquante-soixante : les bâtisseurs & les fondations

4.1. Cristallographie rayons X: Années 50-60

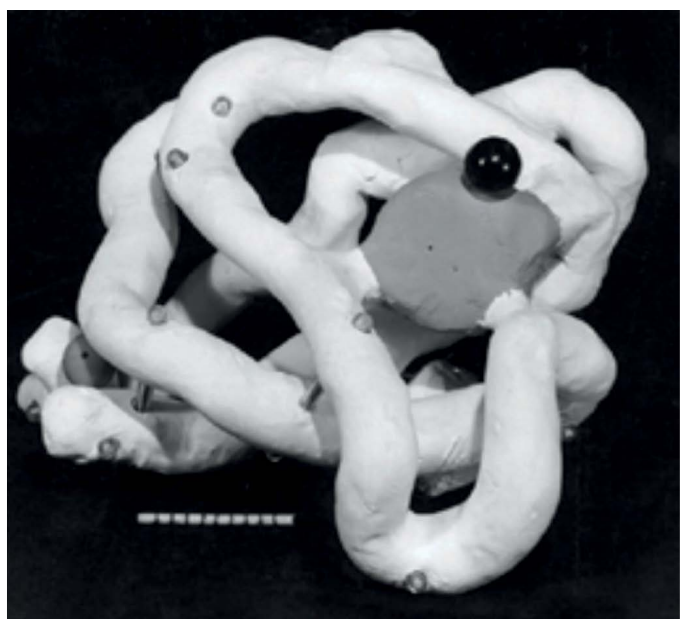
C'est aux USA que les bases de la structure secondaire des protéines seront posées grâce aux travaux de Linus Pauling. Alors que Pauling n'avait jamais résolu de structure, il déduisit de manière théorique, en 1951, la structure de l'hélice alpha à partir de la géométrie des liaisons chimiques reliant entre eux les acides aminés des protéines. En 1953 il décrit la structure des feuillets Béta. Il suivit la prédiction d'un de ses maîtres qui affirmait que toute structure moléculaire ne pouvait s'échafauder qu'en « avançant » « et en « tournant » à la manière d'une hélice [9]. Sa connaissance fine de la chimie lui permit de prédire de façon presque exacte le pas et le rayon de l'hélice.

C'est en Angleterre que seront déterminées, grâce à la solubilisation du problème de phase par la technique du remplacement isomorphe consistant à substituer un ou plusieurs atomes par un atome lourd, les premières structures cristallographiques de protéines par les chercheurs John Kendrew et Max Perutz (originaire d'Autriche et immigré en 1936). Ces derniers publient respectivement la structure de la myoglobine en 1958 et l'hémoglobine en 1960 [5-10-11] (figure 2 a).

Anfinsen propose en 1957 un premier modèle de pliage moléculaire expliquant la structure tridimensionnelle des protéines [12].

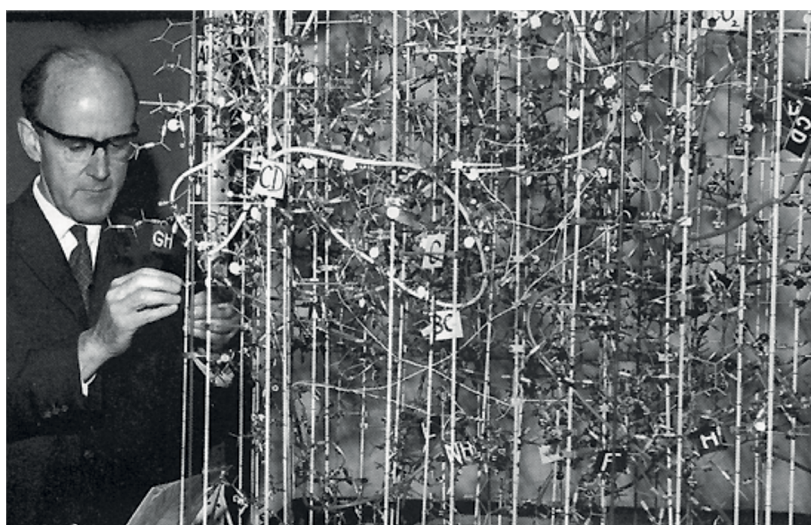
En 1962, dans un laboratoire à Cambridge (USA), Michael Rossmann décrit une variante du remplacement isomorphe appelée « remplacement moléculaire », permettant aux chercheurs d'utiliser une structure existante pour calculer l'orientation et la position d'une structure apparentée, mais inconnue.

Figure 2 a – Image en « pâte à modeler » de la myoglobine.



Source: Kendrew, 1958

Figure 2 b – Image en « boules-fils de fer » de l'hémoglobine.



Source: Perutz, 1960

En 1964 Aaron Klug, travaillant à Cambridge (Angleterre), applique les principes de diffraction des rayons X à la microscopie électronique qui devient « cristallographique ». Cette découverte lui vaudra le prix Nobel de chimie en 1982. En 1965 David C Phillips (Londres) résout la structure du lysozyme et en 1967 les premiers cristallographes américains résolvent plusieurs enzymes ainsi qu'en 1968 la structure des immunoglobulines. [13]

4.2. RMN : années 1950-60

Sur le plan de la RMN trois découvertes essentielles voient le jour : le déplacement chimique, l'effet Overhauser et le couplage J. Le déplacement chimique a été découvert en 1950 par WG Proctor et FC Yu à Stanford University (USA) et WC Dickinson au Massachusetts Institute of Technology. Le phénomène de déplacement chimique est une propriété de modification de la fréquence de résonance du noyau en fonction de son environnement électronique et de sa position dans la molécule. Le physicien américain Albert Overhauser prédit en 1953 que la polarisation de spin nucléaire peut être transférée d'une population de spin à une autre en fonction de la distance interatomique. Le couplage J est une interaction entre plusieurs spins à travers les liaisons chimiques [14]. Les premiers spectromètres RMN à électro-aimant sont commercialisés en 1955. Jardetski publie le premier spectre RMN d'une protéine (la ribonucléase) avec un spectromètre de 40 MHz [14].

Les années 60 furent marquées par l'introduction en 1962 du premier spectromètre doté d'aimant supraconducteur à 200 MHz. En 1964-65 Ernst et Anderson vont mettre au point la séquence de transformée de Fourier pulsée. Ces recherches vont conduire à la conception d'une nouvelle machine intégrant directement la transformée de Fourier par l'entreprise Bruker.

4.3. La cryo-EM : années 50-60

En 1968 David de Rosier et Aaron Klug [15] présentent une technique de reconstruction 3D de microscopie électronique d'une queue hélicoïdale de virus bactériophage T4. Ils uti-

lisent les principes de Fourier et les fonctions de Bessel pour combiner de multiples vues 2D des molécules naturellement présentes dans la structure symétrique du virus. Les trois principales difficultés sont : la nécessité de mettre l'échantillon sous vide et de le dessécher (ce qui ne convient pas à l'examen des macromolécules dont le milieu naturel est hydraté), les dommages causés par le rayonnement et le très faible contraste spontané. Rosier et Klug introduisent la coloration par les sels de métaux lourds (acétate d'uranyle) qui génèrent une image plus contrastée et réduisent les dégâts d'irradiation.

4.4. Modélisation : années 50-60

Dans les années 60, les cristallographes, les biologistes informaticiens et les chimistes s'intéressent aux méthodes les plus appropriées de visualisation, mémorisation et communications des données moléculaires. Cependant la méthodologie pour contenir les données n'était pas bien définie. Dans les années avant l'internet, il

était nécessaire d'envoyer par voie postale les informations sous forme de boîtes de cartes perforées ou des bandes magnétiques. [16]

Le premier modèle moléculaire fut bâti par Kendrew en 1957 pour la myoglobine en pâte à modeler à une échelle de 5 cm/Angstrom et un plus tard il construisit un modèle géant désigné « forest of rods ». Il fut construit avec 2 500 barres métalliques disposées dans un cube de 2 mètres de côté. Des petites boules colorées étaient attachées aux tiges pour représenter les atomes. Cette forêt de tiges métalliques obscurcissait la vision globale de la molécule. [16-17] (figure 2 b).

En 1968 Fred Richards introduit un comparateur optique permettant de fabriquer plus rapidement les modèles en laiton de style Kendrew. Les densités électroniques résultant d'études cristallographiques étaient imprimées par ordinateur sur papier. Un système de miroir permettait de superposer la carte de densité électronique sur le modèle laiton. Ce procédé de visualisation fut dénommé la Richard's Box. [16-17] Parallèlement, apparaissent les premiers programmes informatiques pour la visualisation des protéines assistées par ordinateur. Levinthal utilise un oscilloscope commandé par ordinateur pour afficher l'image en rotation d'une structure protéique.

5. Les années 1970-80 : résolution par diffraction RX et RMN des petites protéines solubles et les débuts de la cryomicroscopie électronique

5.1. Années 70-80 : cristallographie rayons X

Pendant les années 70 la procédure de résolution moléculaire par cristallographie rayons X nécessite globalement 5 à 7 ans, commençant par une année consacrée à la purifi-

Des calculs de transfert à plus longue distance par interaction dipolaire permettent, par des méthodes itératives de reconstituer la structure 3D [19]. Une métaphore permet de mieux comprendre comment la table des distances interprotoniques en entrée peut générer en sortie la structure de la molécule : c'est comme si en entrée nous avions la table des distances de ville à ville et en sortie la carte des états unis (*figure 3b*) [20].

Plusieurs publications voient le jour et définissent les structures de petites protéines comme l'inhibiteur de trypsine pancréatique bovine en 1982.

Parallèlement aux USA sont mises au point des techniques 2D hétéronucléaires, par les chercheurs Bodenhausen et Ruben du MIT qui corrélaient le déplacement chimique du noyau azote ou carbone au déplacement du proton auquel ils sont liés.

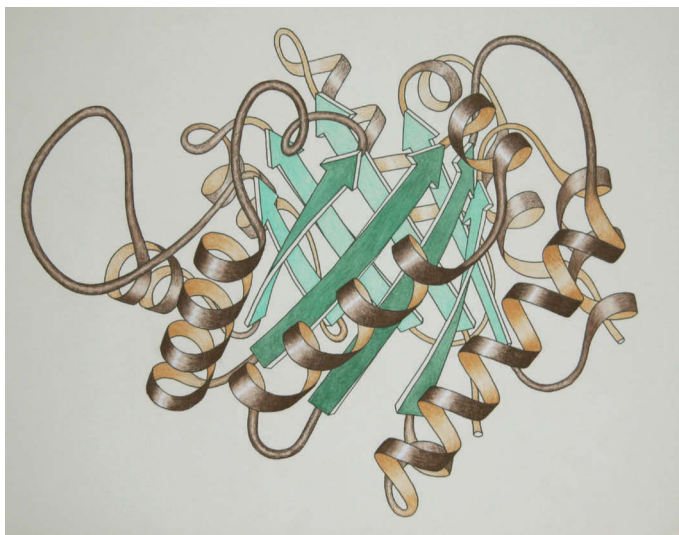
5.3. Cryo-microscopie électronique : années 70-80

En 1974 Ken Taylor et Robert Glaeser montrent la faisabilité d'utiliser une technique de spécimen congelé-hydraté en microscopie électronique permettant de se rapprocher des conditions biologiques réelles.

Vers 1980, au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (EMBL) à Heidelberg, Jacques Dubochet trouve le moyen de garder l'eau dans le microscope électronique en refroidissant l'objet tellement rapidement que l'eau s'immobilise sans avoir le temps de cristalliser en glace. Ce procédé s'appelle la vitrification de l'eau. À -170 degrés, l'eau garde la structure du liquide et le spécimen reste intact [21].

Les chercheurs de Cambridge (Klugg, Crowther, Henderson) et d'autres ont mis au point différentes techniques de reconstruction 3D de différentes projections 2D de l'objet correctement remises en ordre. Chaque spécimen observé au microscope ne contient une seule particule mais des milliers voir des millions immobilisés au hasard dans la mince couche de suspension vitreuse.

Figure 4 – Dessin de Jane Richardson de la triose phosphate isomérase.



© Jane Richardson, 1981

5.4. Modélisation / PDB : années 1970-80

Les années 70 virent naître, sous l'égide de Walter Hamilton, Edgard Meyer et Olga Kennard la mise en place de la première base de données protéique (Protein Data Bank PDB) au Brookhaven national laboratory suite à un Symposium sur la structure et la fonction des protéines au niveau tridimensionnel en 1971[22].

Dans les années 80, la PDB monte en puissance, pilotée par un comité d'expert issu de l'IUCr (L'Union Internationale de Cristallographie). Les efforts conjoints de Fred Richards et des membres du comité aboutirent à la publication d'un guide pratique en 1989. Le dépôt des données structurales dans la PDB est un pré-requis pour toute publication. Jane Richardson, du laboratoire de cristallographie du Duke University présente en 1977 un modèle général de classification de protéines à partir des motifs structuraux récurrents (hélice alpha, feuillet B, boucle ou coude) [23] (*figure 4*).

Elle publie en 1981 les dessins (*figure 4*) de son interprétation de la structure des protéines. Ces dessins avaient pour but de rendre les structures plus compréhensibles [17]. Effectivement, leur éloquence fera qu'ils seront rapidement adoptés par la communauté scientifique, le « *ribbon diagram* » était né. En 1982, Lesk et Hardman conçoivent un logiciel de génération automatique de structures.

6. Les années 90-2005 : résolution par diffraction RX et RMN des protéines de membrane et des grosses protéines ; les gains en résolution de la cryo-microscopie électronique

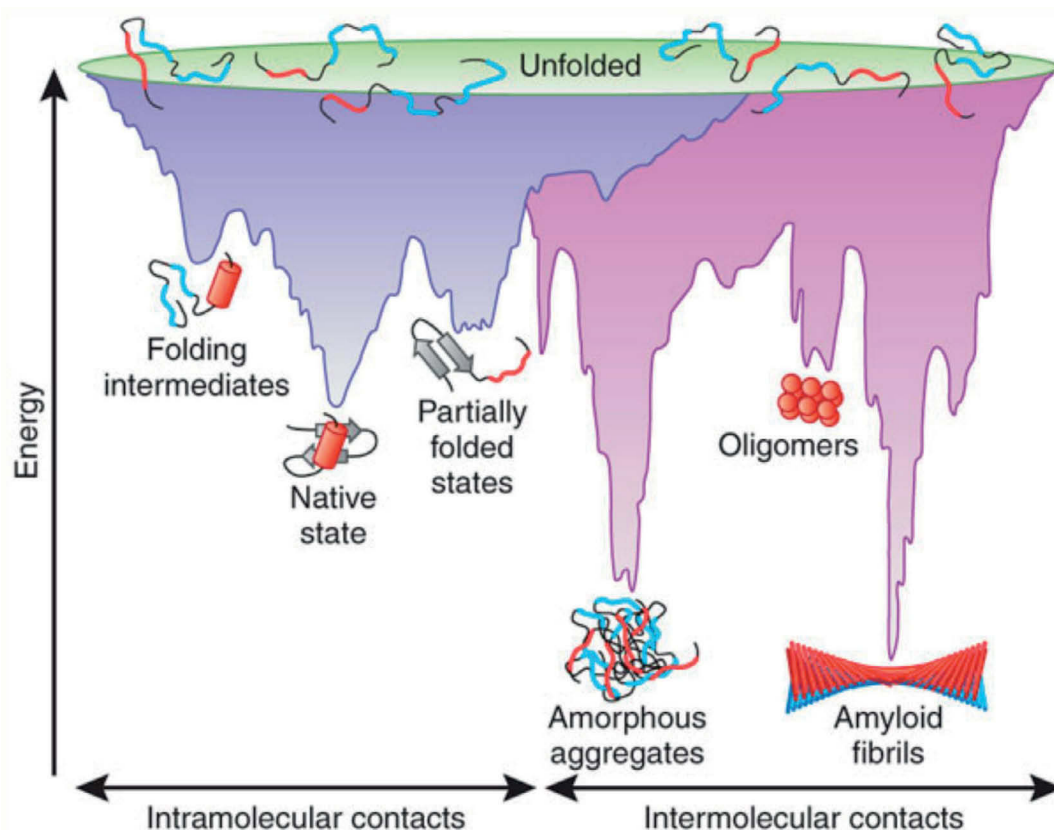
6.1. Cristallographie Rayons X : années 90-2005

Wayne Hendrickson et ses collègues mettent au point la méthode de diffraction « anormale » multi longueur d'onde (multiwavelength diffraction anormale (MAD) par incorporation d'atomes de sélénométhionine remplaçant la méthionine naturelle. Cette méthode permet de réduire le temps de résolution à 1 à 2 ans.[4]

Durant les années 90, les protéines kinases AMP cyclique dépendent font l'objet d'études structurales approfondies. Suzan Taylor et ses collaborateurs proposent, à partir des études structurales et par comparaison d'alignement de séquences un nouveau concept de « colonne vertébrale moléculaire » reliant les 2 sous unités de la protéine kinase permettant une flexibilité conformationnelle nécessaire à la fixation de l'ATP préalable à la phosphorylation sur la boucle d'activation [24]. Ses recherches ouvrent la voie à l'idée d'une régulation allostérique induite par des changements de conformation moléculaire. Ce champ de connaissance est le préalable à la découverte de nouveau type d'inhibiteur dans le cadre des thérapies ciblées.

Parallèlement, Peter Wolynes [25] énonce la théorie du paysage énergétique moléculaire comme un nouveau modèle de repliement des protéines faisant intervenir des

Figure 5 – diagramme énergétique du repliement des protéines normales ou pathologiques.



Source : Ulrich H, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo* F. Nature Struct & Molec Biol 2009; 16 (6): 574-581

notions thermodynamiques. La représentation en forme d'entonnoir du paysage énergétique décrit la transition de conformations de protéines du désordre à l'ordre (figure 5). Rod Mac Kinnon publie en 1998 la première structure à haute résolution d'un canal ionique.

Pour ce travail Mc Kinnon a partagé le prix Nobel 2003 de chimie [26].

6.2. La RMN : Années 90-2005

La méthode d'attribution séquentielle de Wuthrich est limitée aux petites protéines (moins de 80AA ou moins de 30kd). Les protéines plus grosses sont à l'origine d'artefacts de superposition et d'élargissement des pics.

L'équipe de Bax aux USA ouvre la voie des analyses multidimensionnelles des protéines marquées. Bax lui-même déclarait ne pas avoir assez de patience pour décrypter des documents de plus de un mètre de côté constellés d'innombrables minuscules tâches de résonance devant être attribuées « manuellement » de manière plus ou moins fiable aux différentes structures atomiques. L'enrichissement isotopique, l'amélioration des sondes radiofréquence, des champs magnétiques plus puissants et la résolution du problème de bruit de fond protonique lié à l'eau ont grandement contribué à améliorer la qualité de la résolution spectrale, la fiabilité et la vitesse d'exécution des expériences. [27]

Les années 90 ont vu aboutir la résolution RMN des protéines membranaires qui par définition échappent aux

techniques « en solution » et grâce au concept d'angle magique de rotation (« *magic angle spinning* » MAS) [28]. Un chercheur avait noté en tournant sa cuillère dans sa tasse de thé qu'il serait utile de faire tourner la molécule selon un angle dit magique pour obtenir le tenseur de déplacement chimique anisotrope et recalculer les pics.

En 1997 l'équipe de Wuthrich et al. met au point une nouvelle séquence dénommée TROSY (Transverse Optimized Relaxation Spectroscopy). Le principe est d'optimiser le phénomène de relaxation transverse (par allongement du temps de relaxation T2) est élaborée par K. Pervushin et K. Wuthrich [29] afin d'obtenir un spectre RMN affiné pour les grosses protéines dont l'étude était classiquement limitée par la largeur des pics qui augmentent avec la masse moléculaire pour résoudre les grosses protéines.

En 2000 Tycko et ses collaborateurs finalisent la technique du couplage dipolaire résiduel (residual dipolar coupling RDC) qui donne des informations structurales de distances et d'angles analogues aux techniques précédentes mais applicables aux molécules de grandes tailles [30]. L'effet RDC est observé dans une solution dite « légèrement orientante » obtenue grâce à l'introduction de cristaux liquides ou diverses substances.

L'étude des pseudos contact de déplacement chimique (Pseudocontact chemical shift PCS) grâce aux protéines para magnétiques permet de caractériser les tenseurs d'anisotropie.

Les 2 techniques conjointes RDC et PCS permettent grâce à des logiciels appropriés (Rosetta) de résoudre des structures de grosses protéines.

L'analyse de la relaxation du à la modulation des interactions dipôle – dipôle entre moments magnétiques de spin permet de remonter aux mouvements moléculaires sur une échelle de temps de l'ordre de quelques nanosecondes à la picoseconde. Les mouvements plus lents à l'échange de la microseconde, voire de la seconde peuvent aussi être abordés par RMN [20].

6.3. Cryo-EM: années 90-2005

Les chercheurs continuent de progresser dans la résolution atomique par cryo-EM et le développement d'outils informatiques de reconstruction 3D à partir des différentes images de projection 2D appelées reconstruction de particules uniques. Des avancées sont obtenues sur des molécules symétriques ou bien hélicoïdales bien ordonnées (pouvant être considérées comme des cristaux 1D). Ainsi Unwin de Cambridge en 1995 publie son étude du récepteur à l'acétylcholine en utilisant un processus de congélation rapide pour piéger l'état ouvert du canal avant inactivation [31].

En 1997, Crowther (Cambridge) résout la structure du virus de l'hépatite B (symétrie icosaédrale) à 7 Ångström. En 1998 une avancée majeure est réalisée avec la mise en œuvre de technique statistique (maximum de vraisemblance) pour la reconstruction tridimensionnelle permettant de réduire les défauts de résolution liés aux bruits de fond.

6.4. PDB: années 90-2005

Dans les années 90 le NIGMS (*National Institute of General Medical Science*) devient la 1^{re} agence à imposer des pré-requis pour le dépôt des structures.

L'ancien format de fichier PDB créé en 1974 évolue pour intégrer des structures moléculaires plus complexes. Le fichier mmCIF est introduit en 1996 après une série de réunion et de congrès. Joel Sussman prend la direction de la PDB en 1994. Cette formation évolue vers un consortium en 1998 sous l'égide de la *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB). La RCSB PDB collabore avec des centres européens et japonais. Ceci débouche en 2003 sur la création de la *WorldWide Protein Data Bank* (wwPDB) [32].

Les années 90 voient fleurir la multiplication des logiciels de visualisation moléculaire. Parmi ceux-ci, *RasMol* en 1993 est un logiciel gratuit pouvant fonctionner sur un ordinateur personnel et largement accessible [16]. Plusieurs autres logiciels sont sortis depuis: *Visual Molecular Dynamics* (VMD) en 1995, Chime en 1996 et PyMOL en 1999.

Le scientifique et dessinateur David Goodsell réalise des dessins au niveau moléculaire pour expliquer les concepts de la biologie cellulaire. Ses illustrations constituent une aide pédagogique pour l'enseignement de la biochimie [33]. Une vidéo est produite en 2006: «*the inner life of the cell*» [16-17].

En 1998 la technique de visualisation moléculaire par «*space filling model*» est implémentée sur logiciel pour l'étude des protéines. Cette méthodologie est particulièrement utile pour l'étude des surfaces de Van-der-Waals et l'examen de contact atomique entre protéines ou protéine-ligand.

7. Les années 2005-2016: la convergence bio-informatique des techniques (diffraction RX, RMN, cryo-EM), la standardisation et l'interopérabilité des bases de données et la modélisation dynamique

7.1. Cristallographie Rayons X: années 2005-2016

En 2007, Brian Kobilka et ses collègues résolvent la première structure d'une protéine G couplée à un récepteur. Cette prouesse technologique fut rendue possible par une innovation dans la technique de cristallisation couplée à un anticorps permettant de stabiliser les structures macromoléculaires de membranes [34].

L'utilisation du laser à électrons libres à rayons X (XFEL) avec impulsions femtosecondes sur des flux de nano cristaux permet à partir des années 2000 de franchir un cap décisif en vitesse de résolution et en protection de structure moléculaires contre le rayonnement ionisant. La Cristallographie femtosecondes rend désormais possible l'imagerie des cellules vivantes à des résolutions subnanométriques [35]. À terme cette méthode pourrait même ne plus nécessiter d'étape de cristallisation.

7.2. RMN: années 2005-2016

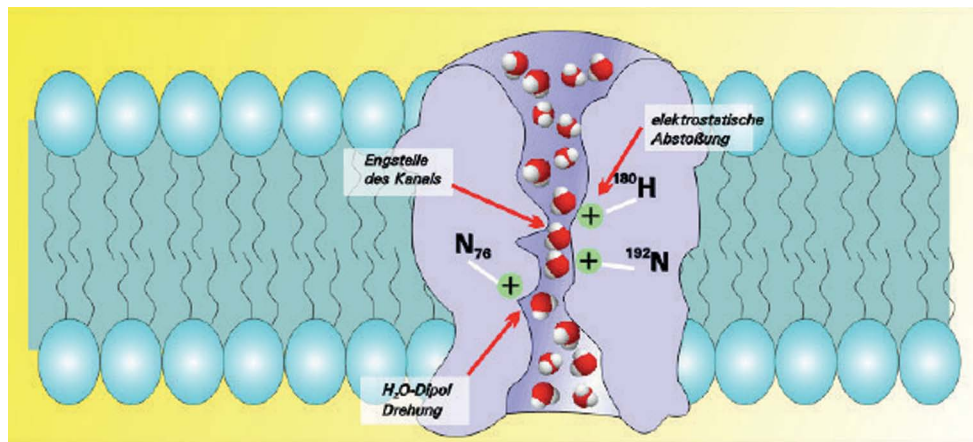
Les techniques récentes d'études RMN donnant des informations d'orientation à longue portée comme le couplage dipolaire résiduel (RDC) et les déplacements chimiques de pseudo contact (PCS) sont mises en œuvre pour analyser les aspects dynamiques des macromolécules. Ces études permettent d'étudier par exemple la dynamique du protéasome. [36]

La RMN intra-cellulaire introduite en 2001 par Serber pour les procaryotes devient éligible pour les eukaryotes grâce aux travaux des chercheurs japonais Inomata et al. Le principe est d'internaliser des protéines marquées grâce à des méthodes de pénétration transmembranaire. Il s'agit d'étudier les protéines dans leur environnement cellulaire *in vitro* ce qui représente une avancée majeure pour la compréhension des mécanismes cellulaires physiologiques ou pathologiques [37].

La RMN se positionne aussi comme une méthode de choix d'étude des protéines intrinsèquement désordonnée (protéine tau, protéine p53, synucléine, calcineurine) [38].

En effet ces protéines mal définies, hautement flexibles, nécessitent une approche plurielle combinant RMN, Cristallographie et modélisation dynamique. Les protéines amyloïdes comme les protéines prions ont la particularité de s'oligomériser suite à un changement de conformation puis de se propager de part en part et précipiter en fibres amyloïdes créant le substratum moléculaire de plusieurs grandes maladies neuro-dégénératives. Une connaissance accrue de ces mécanismes est le pré-requis pour la découverte de nouvelles thérapies moléculaires appropriées.

Figure 6a – Schéma générique de l'aquaporine.



Source : Peter Wolber

Fig 6b – Aquaporine 1 : modélisation moléculaire d'après cristallographie électronique.

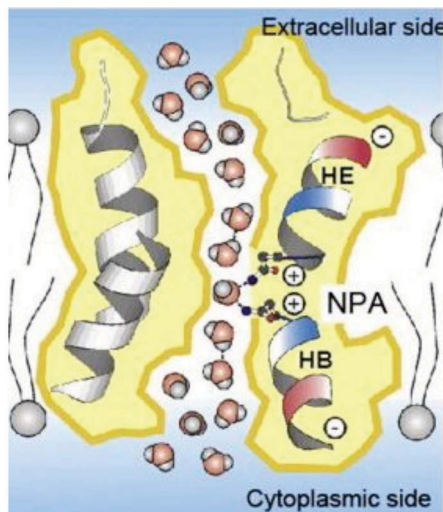
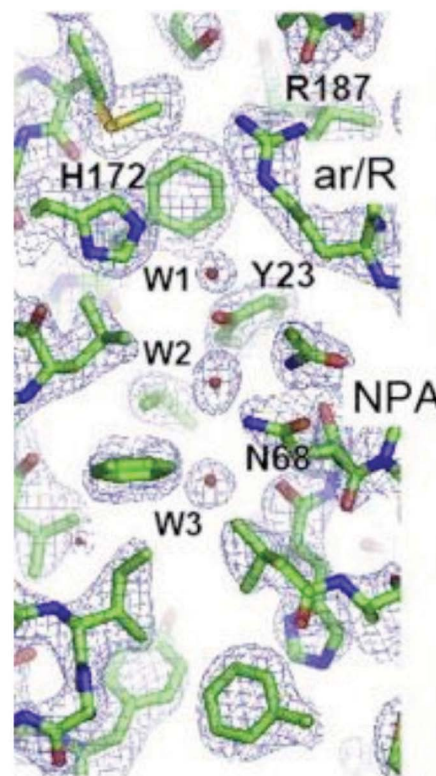
Source : d'après *Biochimica et Biophysica Acta* - Yoshinori Fujiyoshi 2000 et 2014

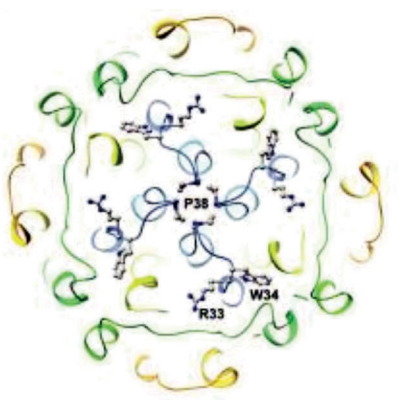
Fig 6c – Aquaporine 0 avec les molécules d'eau (W1, W2 et W3) visibles par la technique de cryomicroscopie.



Les molécules d'eau ne seraient pas visibles par cristallographie rayons X; cette technique permet d'accréditer l'hypothèse que les molécules d'eau sont bien distantes au-delà de la distance autorisée pour les liaisons hydrogène; la rupture des liaisons hydrogène dans cette zone de rétrécissement moléculaire expliquerait le mécanisme d'imperméabilité sélective de l'aquaporine aux protons.

Source : d'après *Biochimica et Biophysica Acta* - Yoshinori Fujiyoshi 2000 et 2014

Figure 6d – Vue extracellulaire de l'aquaporine en cryomicroscopie électronique. la proline 38 forme une structure en rosette au centre du tétramère.



Source : Tom Walz, 2005

En 2015 des chercheurs de l'école polytechnique fédérale de Lausanne, de l'institut de biologie structurale de Grenoble et de l'école normale supérieure de Lyon viennent de mettre au point une technique d'observation directe de la dynamique des protéines par RMN multi nucléaires à angle magique en utilisant une méthodologie de décongélation progressive en portant les protéines à -168 C°, les chercheurs ont pu stopper les mouvements moléculaires puis en augmentant la température, observer les mouvements de la molécule de façon hiérarchique : molécule du solvant puis chaîne latérale et enfin colonne vertébrale [39].

7.3. Cryo-EM: années 2005-2016

Une performance en très haute résolution est obtenue en 2005 par Cryo electro microscopie sur cristal 2D de l'aquaporine à 1,9 Å par Tom Walz et Steve Harrison [40] (figure 6). Les molécules d'eau ne seraient pas visibles par cristallographie rayons X; cette technique permet d'accréditer l'hypothèse que les molécules d'eau sont bien distantes au-delà de la distance autorisée pour les liaisons hydrogène; la rupture des liaisons hydrogène dans cette zone de rétrécissement moléculaire expliquerait le mécanisme d'imperméabilité sélective de l'aquaporine aux protons d'après Yoshinori Fujiyoshi [45] (figure 6).

Les différentes techniques de reconstruction 3D citées précédemment en cryo-EM sont progressivement incorporées dans des logiciels de visualisation moléculaires (SPARX, Xmipp, RELION) [41]

En 2012, une petite révolution scientifique et technique est l'introduction d'une nouvelle gamme de caméra de détection directe des électrons (*Direct Detecteur Device* DDD) en lieu et place des traditionnelles caméras CCD (*Charge Coupled Device*). Les anciennes caméras CCD nécessitaient une conversion des électrons du microscope en photons par interaction avec un scintillateur. Cette découverte dont Grigorieff N. (*Massachusetts Institute of Technology*) était le pionnier, a permis de faire rentrer la cryo-EM sous la barre des 2-3 Angström de résolution [41].

L'enthousiasme lié aux progrès enregistrés dans la résolution de plus en plus précise des images de cryo-EM a été tempéré par une controverse sur une structure de protéine virale HIV publiée dans la revue PNAS en 2013 dont les experts ont prouvé ultérieurement qu'il s'agissait d'une image totalement erronée.[42] Cette controverse reprise par Henderson Richard (Cambridge, Royaume-Unis) la même année décrivant l'effet « *Einstein from noise* », c'est-à-dire la production d'une image purement construite à partir de bruit de fond.

Cette controverse a renforcé la communauté scientifique internationale dans l'absolu nécessité de définir des standards contrôlés et validés.

7.4. PDB: années 2005-2016

La standardisation et l'harmonisation des procédures d'intégration de données permettent la mise en place d'un langage commun entre différentes techniques et différentes communautés. Ainsi le format de fichier mmCIF permet de faire évoluer le dictionnaire vers une intégration des données RMN et 3D cryo aboutissant

à renommer les données au format « mmCIF » au sein d'un dictionnaire d'échange appelé « PDBx » [17, 22]. Le format mmCIF de PDBx sera généralisé à partir de 2011 au décours d'un congrès entre les représentants de la wwPDB et les principaux développeurs de logiciels de cristallographie [32].

Les données déposées dans la PDB sont rigoureusement évaluées et contrôlées. En 2008, 12 structures publiées dans des revues et insérées dans la base sont considérées comme erronées aboutissant à la mise en place d'une commission appelée Validation Task Force désignée pour mettre en place des recommandations de bonnes pratiques. La commission utilisera différentes méthodes pour évaluer l'intégralité de la base et proposer aux reviewers des critères précis d'éligibilité des structures.

En 2009 Ulrich et al présentent une vue conceptuelle des concepts de repliement appliqués aux protéines normales et pathologiques. Le paysage énergétique montre que le puits maximal de stabilité est obtenu pour la forme de polymère amyloïde qui représente aussi un état irréversible de la protéinopathie. L'accent est mis sur les formes intermédiaires dites « oligomériques » qui seraient le substratum toxique générateur d'agrégation [43].

En 2011 est mis en place par la wwPDB [32] un ambitieux système d'annotations et de dépôts sous forme modulaire. Les données sont soumises à travers un unique portail aboutissant à une procédure automatisée de haute qualité. Ces progrès permettent une interopérabilité des ressources et des systèmes ainsi qu'une lecture plus fluide et sécurisée des données macromoléculaire. Ces méthodes intégratives et multi-échelles qui nécessitent la coordination entre plusieurs disciplines représentent une force motrice qui combine les données expérimentales ainsi que les modélisations moléculaires indispensables pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques et une meilleure compréhension des mécanismes du vivant. La PDB atteignait les 100 000 entrées en 2014.

Les efforts conjoints de la communauté internationale scientifique pour élaborer ces critères qualité ouvrent la voie d'une nouvelle branche de la biologie structurale dite « intégrative » tirant parti des effets de complémentarité et de validation mutuelle des différentes méthodologies, permettant en les combinant le cas échéant d'obtenir une vue élargie des complexes macromoléculaires [44].

8. Conclusion

Le rêve des biologistes et des médecins de voir, avec un détail atomique, comment différentes biomolécules interagissent entre elles et avec des substrats ou des molécules thérapeutiques suivant des schémas dynamiques bien définis se réalise progressivement. Ce rêve est aussi le fruit de découvertes de grande ampleur cédées par les générations antérieures : nous sommes, ainsi que le disait Bernard de Chartres, Maître à penser du XII^e siècle, comme des « nains juchés sur des épaules de géants ».

Liens d'intérêts: les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Briand Y, Brion P, Lafont R et al. « Protéines », Encyclopædia Universalis <http://www.universalis.fr/encyclopedie/proteine>
- [2] Tanford C, Reynolds J. Nature's robots : a history of proteins. Oxford university press, 2001. 304p.
- [3] Authier A. Early day of X-ray cristallography. Oxford university press, 2013. 441p.
- [4] Jaskolski M, Dauter Z, Wlodawer A. A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits. FEBS J 2014 ; 281 : 3985-4009
- [5] Strandberg B, Dickerson RE, Rossmann MG. 50 years of Protein Structure Analysis. J. Mol. Biol. 2009; 392: 2-32.
- [6] Isaacs N. A history of experimental phasing in macromolecular cristallography. Acta cryst 2016; D72 : 293-295.
- [7] Rhodes G. Crystallography Made Crystal Clear. Third edition. Academic press, 2006. 305p.
- [8] Goldman M. Histoire de la RMN : Autour de ses premiers acteurs... et après. Actual Chim 2004 ; 273 : 57-60 .
- [9] Pauling L. How my interest in proteins developed. Protein Sci 1993; 2(6): 1060-1063.
- [10] Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM et al. A three dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. Nature 1958; 181: 662-666
- [11] Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, et al. Structure of haemoglobin: a three dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. Nature 1960; 185: 416-422.
- [12] Histoire de la science des protéines. Yon-Kahn J. Grenoble, EDP sciences 2006: 312p.
- [13] Shi Y. A glimpse of structural biology through X-Ray crystallography. Cell 2014; 159: 995-1014.
- [14] Emsley JW, Feeney J. Milestones in the first fifty years of NMR. Prog Nucl Mag Res Sp 1995; 28: 1-9.
- [15] De Rosier DJ, Klug A. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. Nature 1968; 217: 130-134.
- [16] Dorey S. Les logiciels de visualisation moléculaire dans l'enseignement des sciences de la vie: conceptions et usages. Thèse de doctorat - ENS Cachan, 2012 : 279p
- [17] Martz E, Francoeur E. History of visualisation of biological macromolecules. www.umass.edu/microbio/rasmol/history.htm
- [18] Aue W. P., Bartholdi E., and Ernst R.R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. J Chem Phys 1976 ; 64 (5): 2229-2246.
- [19] Mispelter J. Principes de la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). 2007 Institut Curie, INSERM.
- [20] www.biochimie-lille1.overblog.com
- [21] Dubochet, J., Lepault, J., Freeman et al. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. J. Microsc 1982; 128: 219-237.
- [22] Berman HM, Kleywegt GJ, Nakamura H et al. The Protein Data Bank at 40: Reflecting on the Past to Prepare for the Future. Structure 2012; 20 (3): 391-396.
- [23] Richardson JS. B-sheet topology and the relatedness of proteins. Nature 1977; 268: 495-500.
- [24] Kornev AP, Taylor SS. Dynamics-Driven Allostery in Protein Kinases. Trends Biochem Sci 2015; 40 (11) : 628-647.
- [25] Frauenfelder H, Sligar SG, Wolynes PG. The energy landscape and motions of proteins. Scienceimage001.gif1991; 254: 1598.
- [26] Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science 1998; 280(5360): 69-77.
- [27] Bax A. Triple resonance three-dimensional protein NMR: Before it became a black box. J Magn Reson 2011; 213(2): 442-445.
- [28] Shoolery J N. The development of experimental and analytical high resolution NMR. Prog Nucl Mag Res Sp 1995 ; 28 : 37-52.
- [29] Pervushin K, Riek R, Wider G et al. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. PNAS 1997; 94 (23): 12366-12371.
- [30] Tycko, R.; Blanco, F. J.; Ishii, Y. Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way to Create Detectable Dipole-Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR. J Amer Chem Soc 2000. 122 (38): 9340-9341.
- [31] Unwin N. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. Nature 1995; 373: 37-43.
- [32] www.wwPDB.org
- [33] Goodsell DS. The machinery of life. Second edition. Springer Science, 2010. 167p.
- [34] Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM et al. Crystal structure of human beta2 adrenergic G-protein coupled receptor. Nature. 2007; 450(7168): 383-7.
- [35] Bergh M. Feasibility of imaging living cells at subnanometer resolutions by ultrafast X-ray diffraction. Q Rev Biophys 2008; 41: 181-204.
- [36] Sprangers R, Kay LE. Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. Nature 2007. 445(7128):618-22.
- [37] Inomata K, Ohnon A, Tochio H et al. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. Nature 2009 ; 458: 106-110.
- [38] Ozenne V. Etude de la dynamique conformationnelle des protéines intrinsèquement désordonnées par résonance magnétique nucléaire. Thèse. Université de Grenoble, 2012.
- [39] Lewandowski JR, Halse ME, Blackledge M et al. Direct observation of hierarchical protein dynamics. Science 2015; 348 (6234): 578-581
- [40] Gonen, T. Cheng YF, Sliz P et al. T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. Nature. 2005;438:633-638.
- [41] Nogales E. The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. Nature Methods 2016; 13 (1): 24-27.
- [42] Henderson R. Avoiding the pitfalls of single particle cry-electron microscopy: Einstein from noise. PNAS 2013; 110(45): 18037-18041.
- [43] Ulrich H, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo* F. Nature Struct & Molec Biol 2009; 16 (6): 574-581.
- [44] Van den Bedem H, Fraser J. Integrative, dynamic structural biology at atomic resolution-it's about time. Nature Methods 2015; 12(4) : 307-319.
- [45] Tani K, Fujiyoshi Y. Water channel structures analysed by electron crystallography. Biochimica et Biophysica Acta 2014; 1840:1605-1613.

QCM Évaluez-vous !

*Ceci est un questionnaire à choix multiples.
Par conséquent, il est possible que certaines questions
puissent bénéficier de plusieurs réponses possibles.
Dans ce cas, il s'agit de les cocher toutes.*

1 Une des propositions suivantes est fausse:

- ☐ A. La norme de certification des biobanques en France est la norme ISO 15189
- ☐ B. Les biobanques sont des collections d'échantillons biologiques dédiées à la recherche
- ☐ C. Les biobanques françaises perçoivent un budget annuel récurrent de la DGOS
- ☐ D. La norme ISO 9001 peut être appliquée à la certification des biobanques
- ☐ E. Une biobanque peut collectionner à la fois des échantillons tissulaires et des biofluides

2 Une des propositions suivante est vraie:

- ☐ A. Les biobanques françaises ne peuvent collectionner que des échantillons provenant de patients atteints de cancer
- ☐ B. La norme S96-900 n'est pas une norme internationale
- ☐ C. Les hôpitaux financent directement sur leur propre budget leur biobanque
- ☐ D. L'Institut National du Cancer finance les biobanques en 2016
- ☐ E. L'accréditation des biobanques est obligatoire en France

3 Quatre propositions sont fausses:

- ☐ A. L'accréditation des laboratoires d'ACP en France sera obligatoire en 2017
- ☐ B. Seuls les actes de biologie moléculaire peuvent être accrédités selon la norme ISO 15189
- ☐ C. La seule norme d'accréditation des laboratoires d'analyse médicale est la norme ISO 17025
- ☐ D. Le chapitre concernant le système de management de la qualité est un des chapitres de la norme ISO 15189
- ☐ E. L'évaluation de la compétence du diagnostic médical entre dans l'un des points normatifs de la norme ISO 15189

4 Trois propositions sont vraies:

- ☐ A. L'audit des laboratoires d'ACP pour l'obtention d'une accréditation est réalisé par l'organisme COFRAC
- ☐ B. L'audit des laboratoires d'ACP pour l'obtention d'une accréditation est réalisé par l'organisme AFNOR

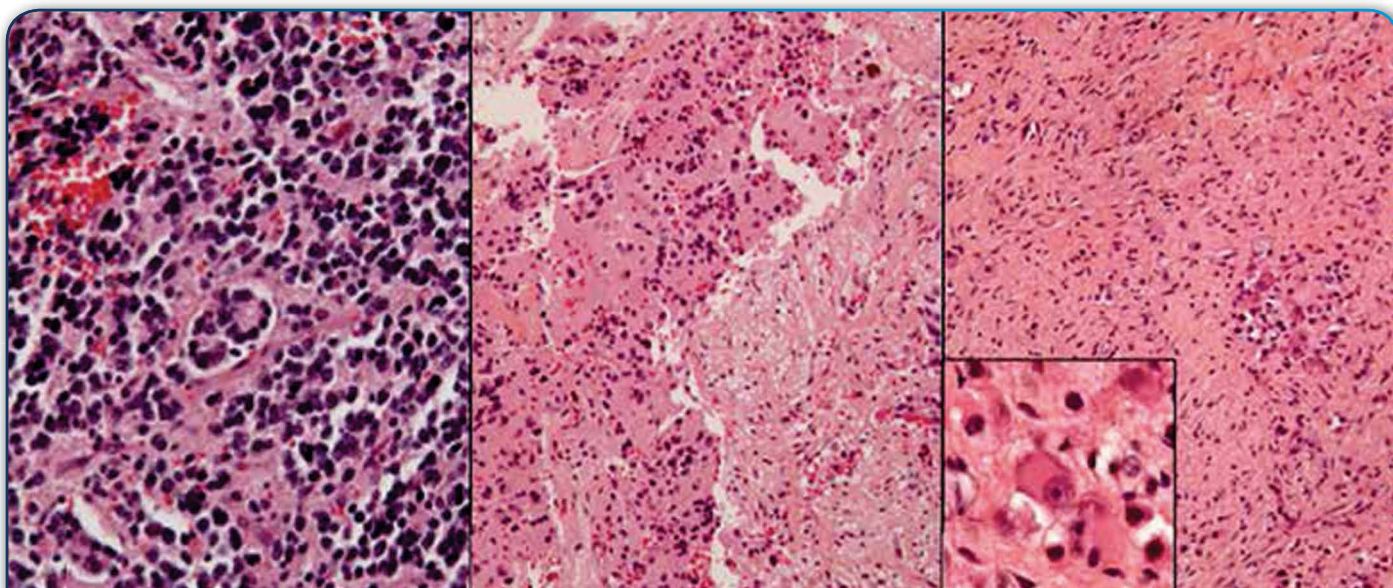
- ☐ C. Les dossiers de validation des méthodes des tests à accréditer doivent être à la disposition du COFRAC avant l'audit réalisé sur site par ce dernier
- ☐ D. La norme européenne la plus souvent utilisée pour l'accréditation des laboratoires d'ACP est la norme CAP
- ☐ E. L'accréditation des tests de pathologie moléculaire peut être obtenue sans l'accréditation des diagnostics histologiques correspondants

5 Parmi ces entités, lesquelles ne retrouverez vous plus dans la prochaine classification?

- ☐ A. Le lymphome folliculaire *in situ*
- ☐ B. Le lymphome à cellules du manteau *in situ*
- ☐ C. Le lymphome diffus à grandes cellules B associé à l'EBV du sujet âgé
- ☐ D. Le lymphome inclassable, présentant des aspect intermédiaires entre un lymphome diffus à grandes cellules B et un lymphome de Burkitt
- ☐ E. Le lymphome à grandes cellules anaplasiques ALK négatif sous forme d'entité provisoire

6 Concernant les lymphomes diffus à grandes cellules B dans la nouvelles classification OMS, quelle est la réponse exacte?

- ☐ A. La classification de Hans ne sera plus utilisée
- ☐ B. Les réarrangements aux loci de *MYC*, *BCL2* et *BCL6* sont tous à rechercher systématiquement pour porter le diagnostic de lymphome diffus à grandes cellules B
- ☐ B. Le diagnostic de lymphome B de haut grade, NOS, est posé en l'absence de réarrangement aux loci de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6* dans un lymphome B de cytologie intermédiaire entre Burkitt et lymphome diffus à grandes cellules B.
- ☐ B. C'est l'index de prolifération Ki67 qui détermine la recherche de réarrangements aux loci de *MYC*, *BCL2* et *BCL6*
- ☐ B. L'expression de la protéine *MYC* supérieure à 40 % dans la population tumorale est toujours corrélée au réarrangement du gène *MYC*



© Louise Galmiche

7 Devant une tumeur à petites cellules rondes:

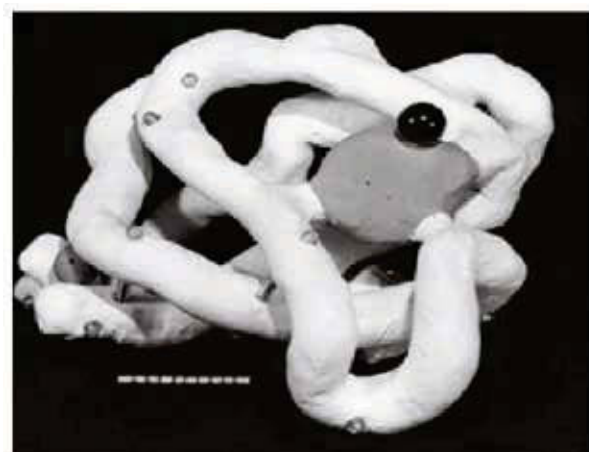
- ☐ A. Le marquage membranaire par le CD99 suffit au diagnostic de sarcome d'Ewing/PNET
- ☐ B. Un diagnostic plus précis peut être porté extemporanément
- ☐ C. La réalisation de prélèvement congelé stocké en tumorothèque doit être réalisée dès que possible
- ☐ D. Le diagnostic de sarcome d'Ewing peut être confirmé par FISH ou en biologie moléculaire
- ☐ E. Le sarcome d'Ewing est la 1^{re} cause de tumeur pédiatrique à petites cellules rondes dans l'os

8 Quelles sont les propositions exactes ?

- ☐ A. Les tumeurs neuroblastiques périphériques sont classées histologiquement seulement selon le degré de différenciation des cellules tumorales
- ☐ B. Les tumeurs neuroblastiques périphériques sont classées selon la classification histologique INPC uniquement en l'absence de traitement préalable, notamment chimiothérapique
- ☐ C. La détermination de l'histopronostic des tumeurs neuroblastiques périphériques est fonction de l'âge au diagnostic, du type histologique et de l'index MKI
- ☐ D. Sur une pièce d'exérèse tumorale pour néphroblastome, les proportions des différentes composantes et des remaniements post-thérapeutiques sont quantifiés, sans tenir compte des atypies cellulaires
- ☐ E. Dans le typage des rhabdomyosarcomes, l'étude immunohistochimique peut apporter une aide

9 Quel homme a résolu la structure cristallographique de la myoglobine?

- ☐ A. William Bragg
- ☐ B. Wolfgang Pauli
- ☐ C. Mark Perutz
- ☐ D. John Kendrew



© Kendrew, 1958

10 Quelle séquence de spectroscopie est particulièrement adaptée aux protéines de hauts poids moléculaires?

- ☐ A. COSY
- ☐ B. TROSY
- ☐ C. NOESY
- ☐ D. EASY

RÉPONSES AUX QUESTIONS

Voir en première page de la rubrique
Entreprise Labo, page 77

Interprétation des résultats du bilan biologique en cas d'intoxication accidentelle au paracétamol

Philippe Hoffmann^a

1. Introduction

Le paracétamol, utilisé en tant qu'antalgique est actuellement le médicament le plus consommé dans le monde [1,2]. La moitié des surdosages sont accidentels par un non-respect des posologies et des délais entre les prises. Au travers d'une présentation de cas, nous avons passé en revue les différents marqueurs biologiques utiles pour évaluer, lors de la validation biologique, l'hépatotoxicité en cas de surdosage en paracétamol. D'autres outils tels que la paracétamolémie et l'utilisation de normogrammes permettent également de conseiller le prescripteur pour la mise en route d'un traitement antidotique par la N-acétyl-cystéine (NAC).

2. Cas clinique

Monsieur N., 35 ans, d'origine roumaine, a été adressé aux urgences par le SAMU, le 17/05/2016 à 04h36, pour un traumatisme de la cheville dans un état d'ébriété et le patient rentre à son domicile avec une ordonnance pour une attelle Aircast® et du paracétamol. Devant des douleurs persistantes, il ingère par la suite 5 x 2 g de paracétamol, entre 7 heures et 17 heures, au cours de la journée. Dans la soirée, il consulte aux urgences pour des douleurs abdominales épigastriques et des vomissements. Un surdosage en paracétamol est alors rapidement suspecté. La paracétamolémie est dosée à 66 mg/L et on observe déjà une importante cytolyse. Un traitement par N-acétyl-cystéine (FLUIMUCIL®) 5 g/25 mL, 100 mg /kg soit 6,5 grammes par prise, est débuté immédiatement et le patient est admis en unité de soins continus. Le patient est parfaitement stable sur le plan clinique. En revanche, la cytolysé détectée à l'admission, continue d'augmenter jusqu'à 8200 UI/L d'ASAT et 6244 UI/L d'ALAT en 3 jours et le temps de Quick (TQ) s'allonge donnant un taux de prothrombine (TP) à 31 % dans la soirée du 18/05/2016. Le 20 mai au matin, le TP est à nouveau revenu à 64 % et on observe pour la première fois une légère diminution de

la cytolysé. Le traitement par 10 g de FLUIMUCIL® par jour est maintenu. Le 19/05/2016, le chirurgien orthopédique prend la décision de remplacer la botte fendue mise en place aux urgences par une attelle Aircast® que le patient devra porter pendant quatre semaines.

Compte tenu de l'état général satisfaisant et de l'évolution favorable de la biologie, le patient est transféré le 20/05/2016 en service de médecine pour la suite de sa prise en charge. Durant son hospitalisation, des vessies de glace le soulagent et il ne souhaite plus de traitement médicamenteux. Il quitte le service contre avis médical le 23/05/2016.

Le patient ne présente pas d'antécédents médicaux particuliers, mais il a évoqué une consommation d'alcool de façon occasionnelle. Durant son séjour à l'hôpital, 2 puis 1 mg de morphine lui ont été administrés en raison d'une estimation à 10 sur l'échelle numérique de la douleur. En plus du traitement par l'antidote du paracétamol, la NAC, le patient a bénéficié d'un traitement symptomatique par SPASFON® et INEXIUM®. Le diagnostic final retenu est une intoxication accidentelle suite à des prises cumulées de paracétamol.

Conjointement aux paramètres de cytolysé et d'hémostase, la recherche de l'antigène HBs (Ag HBs) et le dosage des anticorps anti-virus de l'hépatite C (Ac anti-VHC) ont été réalisés. Leurs résultats ont été négatifs. De plus, le volume globulaire moyen (VGM) et la gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) sont restés constamment élevés durant l'hospitalisation. L'ensemble des examens biologiques et l'évolution de leurs résultats figurent dans le **tableau 1**.

3. Discussion

Le paracétamol est le médicament le plus prescrit dans le monde [1, 2]. Il est recommandé pour le traitement des douleurs modérées et, pour la plupart des personnes qui se traitent par automédication ou suite à une prescription, les risques encourus par la prise de ce médicament sont méconnus, du fait de sa bonne tolérance et de la banalisation de son utilisation. Souvent, ces personnes ignorent qu'il ne faut pas dépasser la dose maximale de 4 g/j chez l'adulte et qu'un délai minimum de 4 heures doit être respecté entre les prises chez le sujet sain [3]. Des cas d'intoxications hépatiques sont d'ailleurs apparus dès l'ingestion de doses modérées, 4 à 5 g par jour et la moitié des intoxications recensées sont d'origine accidentelle. Selon une étude anglaise, la prise chronique de paracétamol augmenterait le risque de toxicité [4].

^a Laboratoire du centre hospitalier de Haguenau
64, avenue du Professeur Leriche - 67500 Haguenau

Correspondance
philippe.hoffmann@ch-haguenau.fr

article soumis le 27 juin 2016 et accepté le 19 septembre 2016
© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

Tableau I – Évolution des marqueurs biologiques.

N° de dosiers	Dates et heures des prélèvements	Glucose (mmol/l) (4.07-5.83)	Lactates (mmol/l) (0,5-2,0)	Phosphore (mmol/l) (0.81-1.58)	Bilirubine totale (μmol/l) (3-17)	ASAT (UI/l) (15-37)	ALAT (UI/l) (16-63)	GGT (UI/l) (5-85)	PAL (UI/l) (50-136)	VGM (fl) 78-98	Ammoniémie (G/l) (11-41)	Paracétamolémie (mg/l) (<30)	TP (%) (>70) /INR	Facteur V (%) (70-120)	Sérologies virales
791063	16/05 22 :45					1755	984				166				
791081	17/05 00 :03											66			
791087	17/05 00 :30		1.8									51	54/1.57	56	
791114	17/05 05 :30				34.2	1783	1108	251		102	157	16.3	45/1.86		
790631	17/05 18 :00					2891	2353					<2	36/2.33		
790451	18/05 08 :29			0.57	28.5	3203	3021	194	61	101	135	3.5	34/2.47		Ag Hbs-Ac anti-VHC -
791776	18/05 17 :44					8284	6244			102	128	<2	31/2.73		
791925	19/05 08 :10			1.09	27.5	7979	8047			101	128		34/2.49		
792547	20/05 08 :00			0.92	37.9	2560	6618						63/1.38		
792638	21/05 05 :30					959	4535	386					80/1.15		
793157	22/05 05 :15				24.7	366	3384	349	83				85/1.11		
793726	23/05 07 :20	4.33			24.2	184	2472	338	84	102	202		98/1.01		

Notre patient n'a pas respecté les posologies décrites dans la notice du médicament et a ingéré 10 grammes de paracétamol en 10 heures, soit une prise de 2 grammes toutes les 2 heures. À son arrivée aux urgences, environ 5 heures après la dernière prise du médicament, il avait déjà des transaminases très élevées qui témoignent d'une répercussion hépatique de l'intoxication.

Le métabolisme du paracétamol, en l'absence de surdosage, se fait par sulfo- et glucuro-conjugaison permettant son élimination sous forme de dérivés hydrosolubles dans les urines [5]. En augmentant les doses, ce métabolisme est saturé et le paracétamol est alors transformé par les cytochromes P450, essentiellement par l'iso-enzyme CYP2E1, en métabolites hépatotoxiques, comme la N-acétyl-parabenzoinquinone-imine (NAPQI) [5, 6]. Le glutathion présent dans les cellules hépatiques permet à ce moment-là de neutraliser les dérivés toxiques, mais le stock de glutathion est rapidement épuisé lors d'intoxication par des quantités plus importantes [7]. Les molécules toxiques, qui ne sont donc plus neutralisées, se lient de façon covalente à des protéines des cellules hépatiques. Ces « adduits protéiniques » ainsi formés, sont responsables de la destruction des cellules du foie [8, 9]. Cette toxicité cellulaire hépatique est dose dépendante et la nécrose hépatique bloque l'élimination du paracétamol en augmentant sa demi-vie [10]. Chez notre patient, les transaminases ont continué d'augmenter de façon importante durant 3 jours avant de régesser. Les valeurs observées dépassent largement 5000 UI/L, ce qui confirme sans aucun doute l'hépatotoxicité. Dans certains cas, la cytolysse peut aller jusqu'à l'insuffisance hépatocellulaire grave, voire mortelle, mais quand elle régresse comme c'est le cas chez notre patient, les hépatocytes sont entièrement régénérés sans laisser de séquelles [11]. L'allongement du TQ et la diminution du facteur V sont d'autres signes témoignant de l'atteinte hépatique. L'allongement du TQ suit l'augmentation des transaminases avec un retour à la normal au bout du troisième jour. Un TP inférieur à 50 % correspond à une insuffisance hépatique aiguë grave, de même que des troubles de la conscience

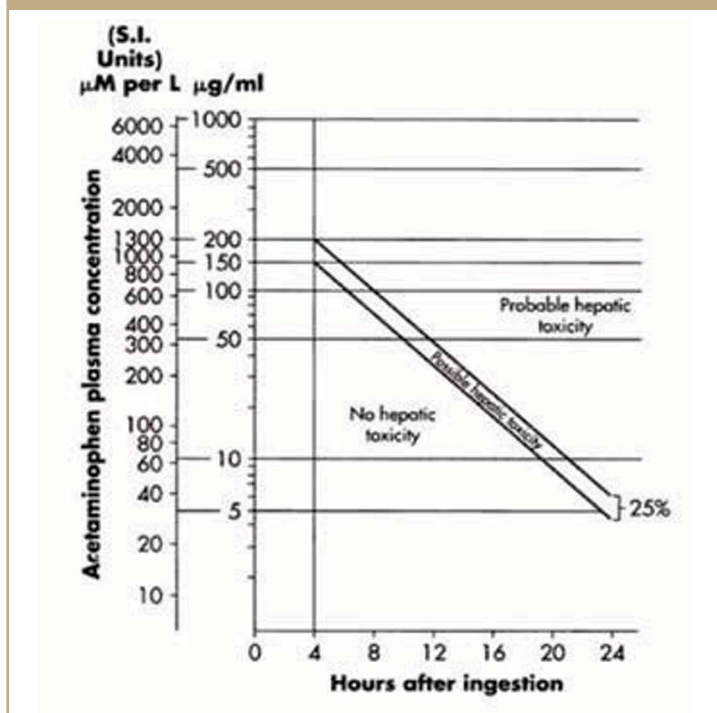
observés en cas d'encéphalopathie métabolique avec augmentation de l'ammoniémie. Une hyperlactatémie, une hypoglycémie et une dysphosphorémie sont d'autres facteurs prédictifs de gravité [12, 13].

Parmi les biomarqueurs utilisables pour diagnostiquer les hépatites médicamenteuses comme celles dues au paracétamol, il y a le rapport entre l'alanine-amino-transférase (ALAT) et les phosphatases alcalines (PAL). Si ce rapport, exprimé en proportion de la limite supérieure de la normale (LNS), est supérieur à 5, il s'agit bien d'une hépatite [14, 15]. Dans le cas de notre patient, l'hépatite est largement confirmée par un rapport de 193 au point le plus élevé de la cytolysse.

Les valeurs de l'ALAT, normalement inférieures à 60 UI/L, permettent de classer les cytolyses hépatiques en mineures (inférieures à deux fois la valeur LNS), modérées (deux à dix fois la LNS) et majeures (supérieures à dix fois la LNS) [16]. La cytolysse observée chez notre patient peut être qualifiée de majeure avec une ALAT dépassant 6000 UI/L. Par ailleurs, l'intensité de l'atteinte hépatique est faible quand la bilirubinémie reste inférieure à deux fois la limite supérieure de la normale et modérée quand elle excède deux fois cette limite. Elle sévère quand l'INR est supérieur à 1,5 [14]. Pour notre patient, la sévérité de l'atteinte se confirme par une augmentation de l'INR jusqu'à 2,73 au pic de la cytolysse, une bilirubinémie à 42 μmol/l (plus de 2 fois la LNS : 17 μmol/l), une hypophosphorémie à 0,57 mmol/l (VN : 0,81 à 1,58 mmol/l) et une hyperammoniémie à 76 μmol/l (VN : 11 à 41 μmol/l) au 3^e jour d'hospitalisation. Par contre, la lactatémie est normale à 1,8 mmol/l (VN : 0,5 à 2 mmol/l) et la glycémie n'a pas été dosée durant la phase critique de l'hépatite. Elle est normale 7 jours après l'événement. Ces différents biomarqueurs, perturbés du fait de la sévérité de l'atteinte hépatique, ont ensuite régressé avec l'amélioration de la cytolysse.

Différents facteurs sont susceptibles de modifier l'hépatotoxicité du paracétamol : parmi les facteurs de risque qui potentialisent l'atteinte hépatique, la dénutrition est responsable d'une diminution des stocks cellulaires de

Figure 1 – Normogramme de Rumack-Matthey [25,26,27].



glutathion, empêchant ainsi une neutralisation suffisante des métabolites toxiques comme le NAPQI [17]. Les maladies hépatiques aiguës ou chroniques font l'objet d'une restriction dans les posologies du fait d'un allongement de la demi-vie du paracétamol et d'un taux de glutathion diminué [18]. Même si la consommation excessive d'alcool fait encore débat, l'alcoolisme chronique est responsable de l'induction enzymatique des cytochromes P450 avec une production accrue de NAPQI et un appauvrissement des cellules hépatiques en glutathion. Les deux effets réunis aggravent l'hépatotoxicité du paracétamol [19, 20]. À l'inverse, l'intoxication éthylique aiguë mettrait en compétition l'alcool et le paracétamol au niveau de l'isoenzyme CYP2E1, ce qui réduirait l'oxydation du paracétamol en NAPQI [21]. Notre patient a indiqué lors

de son admission, une ingestion excessive d'alcool la veille de son intoxication au paracétamol. D'autre part, il prétend ne consommer de l'alcool qu'occasionnellement. Or à l'admission, son bilan biologique révèle une GGT à 290 UI/L et une macrocytose avec un VGM à 102 fl. Ces valeurs qui restent élevées tout au long de l'hospitalisation pourraient correspondre à un éthyisme chronique non avoué et expliqueraient cette cytolysse majeure après une ingestion de doses cumulées, mais tout de même modérées, de paracétamol.

De fortes variations du métabolisme du paracétamol existent entre les individus et les ethnies. Elles portent sur l'importance des quantités de glutathion présentes dans les cellules hépatiques, l'activité des cytochromes P450 et les différents phénotypes de glucuro-conjugaison [17]. Nous n'avons pas trouvé d'éléments expliquant l'hépatotoxicité accrue chez ce patient d'origine roumaine. Nous n'avons pas non plus eu connaissance de la prise d'autres médicaments qui auraient pu interagir au niveau de la glucuro-conjugaison du paracétamol et ainsi augmenter la production de métabolites toxiques [22].

L'évaluation du risque de toxicité hépatique se fait également par le dosage de la paracétamolémie. La méthode enzymatique que nous utilisons (ACTMN Dimension Vista Siemens®) est disponible 24 heures sur 24 et permet l'obtention des résultats en urgence en 25 minutes environ. Ce dosage est relativement fiable mais en cas de suspicion d'interférence, une confirmation par une méthode séparative chromatographique peut être utile. L'interprétation de la paracétamolémie ne peut se faire qu'à la 4^e heure après l'ingestion du médicament [23, 24]. Des concentrations supérieures à 150 mg/l, 4 heures après l'ingestion et de 50 mg/l, 12 heures après l'ingestion sont souvent associées à des réactions toxiques. L'évaluation du risque d'hépatotoxicité se fait en reportant le résultat du dosage sur un normogramme, qui rapporte les concentrations de paracétamol en fonction des délais après l'ingestion. Le normogramme de Rumack-Matthey [25-27] (figure 1) est actuellement l'un des plus utilisés mais il n'est valable que dans le cas d'une seule prise de comprimés. Ce diagramme ne s'applique pas en cas

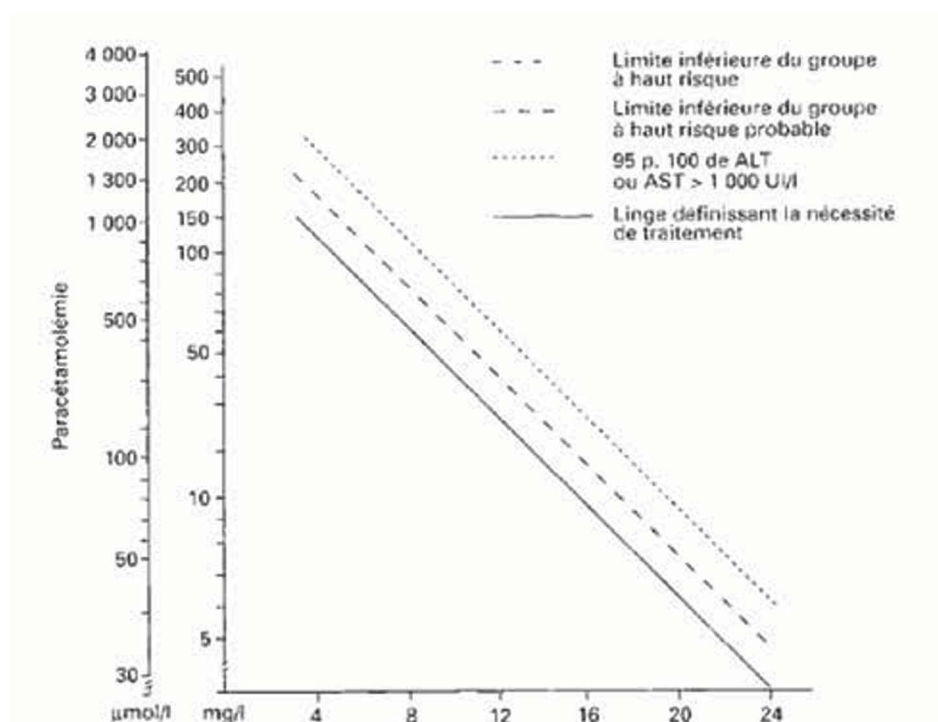
de prises répétées au-delà de 10 heures.

Dans le cas de notre patient, il est encore possible de considérer sa paracétamolémie comme une prise unique et d'utiliser ce normogramme. Le moment d'ingestion qui doit être pris en compte, est celui de la première prise, c'est-à-dire 5 heures du matin dans le cas de ce patient. Son dosage de paracétamol, réalisé à l'admission, correspond à un délai après ingestion de 18 heures et la valeur obtenue, 66 mg/l, se situe largement dans la zone d'hépatotoxicité du graphique. Un nouvel outil, élaboré en 2005, est celui de Buckley [28] (figure 2).

Figure 2 – Normogramme de Buckley [28].



Figure 3 – Courbe de Prescott avec des paracétamolémies limites adaptées à la présence de facteurs de risque [30].



Délai après ingestion	Paracétamolémie (mg/L) Sujet normal	Paracétamolémie (mg/L) Alcoolique, cirrhotique, toxiques hépatiques associés
4 heures	150	100
5 heures	124	74
6 heures	100	60
7 heures	82	47
8 heures	67	40
9 heures	55	32
10 heures	45	26
11 heures	36	21
12 heures	30	17
13 heures	24	14

DR

Il pourrait être utile chez des patients présentant des facteurs de risque lors des intoxications au paracétamol. Une autre façon de tenir compte des facteurs de risque serait de réduire de moitié les concentrations de la courbe précédente [29]. Des concentrations limites plus faibles de paracétamolémie sont d'ailleurs proposées dans le diagramme de Prescott. Ils permettent une interprétation plus précise en cas de facteurs de

risque comme l'alcoolisme ou des atteintes hépatiques chroniques (figure 3). En cas de prises chroniques de paracétamol, ces normogrammes ne sont d'aucune utilité et les critères les plus pertinents sont alors la quantité de paracétamol ingérée et les résultats des examens biologiques [29].

Le traitement des intoxications au paracétamol consiste en l'administration de l'antidote le plus utilisé,

la N-acétyl-cystéine (NAC) [31]. L'instauration du traitement doit se faire dans les 8 heures après l'ingestion et après avoir interprété le résultat de la paracétamolémie à l'aide de l'un des normogrammes [32]. Au-delà de ce délai, le risque d'altération hépatique sévère augmente rapidement. En pratique, si le patient est admis dans les 8 heures après l'ingestion, on attend le résultat du dosage de paracétamol et le traitement sera initié s'il se situe au-delà de la limite de toxicité sur le normogramme. Si le résultat du dosage ne peut être obtenu dans les 8 heures, le traitement par la NAC doit débiter sans attendre [29]. Lorsque l'heure de l'ingestion n'est pas connue, la détermination de la demi-vie du paracétamol permet d'établir l'hépatotoxicité [23, 24]. Normalement, la paracétamolémie diminue de moitié toutes les deux heures. Si elle baisse un peu ou pas du tout, il y a risque d'hépatotoxicité. Pour une demi-vie supérieure à 4 heures, comme c'est le cas de notre patient, la toxicité hépatique est confirmée.

4. Conclusion

De nombreux facteurs cliniques, génétiques et environnementaux ont une influence sur le métabolisme du paracétamol et sont susceptibles de potentialiser son effet toxique sur le foie. L'interprétation des concentrations plasmatiques de paracétamol et des biomarqueurs précédemment cités, permet d'évaluer la sévérité de cette atteinte. L'utilisation d'un des normogrammes est également utile. Il sert aussi à la décision pour l'administration de l'antidote. Mais c'est pourtant la prévention des accidents d'intoxication qui doit être priorisée, en alertant le patient sur les posologies maximales à ne pas dépasser et les délais à respecter entre les prises. La prescription de ce médicament doit aussi tenir compte des éventuels facteurs de risques présents et des traitements associés, susceptibles d'interférer avec son métabolisme.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Prigent A. Même faible, le surdosage de paracétamol est dangereux. *Le Figaro*, 25/11/2011.
- [2] Rivière JP. Prise prolongée de paracétamol à haute dose, une étude anglaise pointe de possibles risques qui nécessitent confirmation. *Vidal.fr*; 04/03/2015.
- [3] Paracétamol, Vidal Optimal, données du 07/06/2016
- [4] Conaghan PG, Roberts E, et al. Paracetamol: not as safe as we thought? a systematic literature review of observational studies. *Ann. Rheum. Dis. (BMJ)* 02/03/2015.
- [5] Aronoff DM, Oates JA, Boudaud O. New insights into the mechanism of action of acetaminophen: its clinical pharmacologic characteristics reflect its inhibition of the two prostaglandin H2 synthases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006;79(1):9-19.
- [6] Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF et al. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 67(3):275-82.
- [7] Slattery JT, Wilson JM, Kalhorn TF et al. Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1987;41(4):413-8.
- [8] Jollow DJ, Thorgeirsson SS, Potter WZ et al. Acetaminophen induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacology* 1974;12(4-5): 251-71.
- [9] Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973;187(1):211-7.
- [10] Berger P. Intoxication par le paracétamol. *JEUR.* 1997;1:5-14.
- [11] Knell AJ. Letter: Risk of hepatic coma in paracetamol poisoning. *Lancet* 1975; 2(7943):1039.
- [12] Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N. Engl. J. Med.* 2013;26;369(26):2525-34.
- [13] Wang DW, Yin YM, Yao YM. Advances in the management of acute liver failure. *World J. Gastroenterol.* 2013;19(41):7069-77.
- [14] Kaplowitz N. Causality assessment versus guilt-by-association in drug hepatotoxicity. *Hepatology* 2001;33(1):308-10.
- [15] Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ et al. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011;89(6):806-15.
- [16] Guyader D. Sémiologie biologique hépatique, Univ-Rennes1-Polycopié Médecine M2-Sémiologie du Foie et des Voies Biliaires, Version Septembre 2005
- [17] Court MH, Duan SX, von Moltke LL et al. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;299(3):998-1006.
- [18] Larrey D. Is there a risk to prescribe paracetamol at therapeutic doses in patients with acute or chronic liver disease? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2006;30(5):753-5.
- [19] Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim. Acta.* 1997;257(1):59-84.
- [20] Lauterburg BH, Velez ME. Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut* 1988;29(9):1153-7.
- [21] Schmidt LE, Dalhoff K, Poulsen HE. Acute versus chronic alcohol consumption in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 2002;35:876-82.
- [22] Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol. Ther.* 2005;106(1): 97-132.
- [23] Schiodt FV, Ott P, Christensen E, Bondesen S. The value of plasma acetaminophen half-life in antidote-treated acetaminophen overdose. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002;71:221-5.
- [24] Castanyer-Puig B, Barcelo-Martin B, Puiguerri-Ferrando J, Rovira-Illamola M, Soy-Muner D, Nogue-Xarau S. Clinical value of estimated half-life in paracetamol poisoning as a complement to Rumack's nomogram. *Med. Clin. (Barc)* 2007;129:501-3.
- [25] Rumack BH, Matthew H. Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics* 1975;55:871-6.
- [26] Rumack BH. Acetaminophen hepatotoxicity: the first 35 years. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002;40:3-20.
- [27] Prescott LF. Paracetamol overdose. Pharmacological considerations & clinical management. *Drugs* 1983;25:290-314.
- [28] Martin TG, Pace AK, Pace SA, Robertson WO. Acetaminophen Nomogram Versus Buckley Categories to Predict Overdose Outcome, Washington Poison Center, Seattle, WA; Loyola University, Chicago, IL 177. *Ann. Emerg. Med.* 2005;46;3:50.
- [29] <http://www.centrentipoisons.be/professionnels-de-la-sant/articles-pour-professionnels-de-la-sant/traitement-des-intoxications-au-paracetamol.be>
- [30] Prescott LF, Roscoe P, Wright N, Brown SS. Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet* 1971;1:519-522.
- [31] Prescott LF et al. Intravenous N-acetylcysteine, the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br. Med. J.* 1979;11:1097-1100.
- [32] Saviuc P. Quelles indications de la NAC en 2009? Centre de Toxicovigilance, CHU, de Grenoble.

DROIT DES CONTRATS

Réforme du droit des contrats : la formation du contrat

Nous continuons l'étude de l'ordonnance réformant les contrats commencée dans les précédents numéros de RFL, par la suite des conditions de formation du contrat, et terminons par l'analyse des effets et de l'exécution du contrat.

Le contenu du contrat

L'objet et la cause du contrat disparaissent du Code en apparence

L'objet et la cause sont des notions essentielles. Nous les avons traitées au sujet des contrats de prévoyance pour les LBM dans un numéro précédent de RFL.

L'objet certain du contrat disparaît du Code civil en tant que condition de validité du contrat au profit de l'exigence d'un contenu certain et licite. Cette disparition n'est qu'apparente car la notion d'objet se retrouve dans d'autres nouveaux articles du Code : l'article 1163, al. 1 et 2 qui prévoit que l'obligation a pour objet une prestation présente et future et que celle-ci doit être déterminée ou déterminable ; l'article 1170 selon lequel toute clause qui prive de sa substance l'obligation essentielle du débiteur est réputée non écrite. Il est difficile de savoir si ce changement de terminologie sera ou non sans conséquences.

Disparaît également la cause licite qui était prévue par l'ancien article 1108 en tant que condition de validité du contrat.

Cette disparition ne signifie pas qu'un contrat dépourvu de cause ou pourvu d'une cause illicite est valable. En effet, deux articles sauvegardent le rôle essentiel de la cause : l'article 1168 aux termes duquel, dans les contrats à titre onéreux, la prestation doit avoir, au moment de la formation du contrat, une contrepartie ni illusoire ni dérisoire ; l'article 1162 selon lequel le contrat ne peut pas déroger à l'ordre public par son but, que ce dernier ait été connu ou non par toutes les parties.

En outre, ces textes mettent ainsi fin à un débat doctrinal opposant les partisans de la cause objective aux partisans de la cause subjective en les reconnaissant toutes les deux formellement : la cause objective à travers la condition de contrepartie et la cause subjective à travers le but du contrat.

Le déséquilibre significatif fait son apparition dans le Code

L'article 1171 introduit le déséquilibre significatif en droit commun du contrat : dans un contrat d'adhésion, toute clause qui crée un déséquilibre significatif entre les droits et obligations des parties au contrat est réputée non écrite (al. 1).

Jusqu'à présent, la notion de déséquilibre significatif n'existait que dans des textes spécifiques : le Code de la consommation sanctionnant les clauses abusives des contrats conclus entre professionnels et consommateurs et le Code de commerce



© Trueffelpix/fotolia.com

pour les contrats conclus entre un producteur, commerçant, industriel ou personne immatriculée au répertoire des métiers avec un partenaire commercial.

Voici les grandes lignes de cette nouvelle mesure :

Seuls les contrats d'adhésion sont concernés par cette nouvelle mesure.

L'appréciation du déséquilibre significatif :

- s'effectue au regard de l'économie générale du contrat et non clause par clause ;
- ne doit pas porter sur l'objet principal du contrat ;
- ne peut pas porter sur l'adéquation du prix à la prestation (al. 2) car admettre le contraire reviendrait à prendre en compte la lésion, ce qui est condamné par le nouvel article 1168.

La notion de déséquilibre significatif au sens de l'article 1171 est plus restrictive que celle de l'article L 442-6, I-2o du Code de commerce qui n'opère aucune restriction dans l'appréciation du déséquilibre et permet ainsi de prendre en compte la lésion.

La clause créant le déséquilibre significatif est réputée non écrite. Elle n'est donc pas opposable au cocontractant.

Dispositions générales pour la nullité et la caducité du contrat

Nullité du contrat

Les nouvelles dispositions sur la nullité consacrent pour la plupart, explicitement ou implicitement, la jurisprudence existante, notamment la distinction entre nullité absolue et nullité relative, le maintien du contrat en cas d'annulation d'une ou de plusieurs

RÉPONSES AUX QUESTIONS DU QCM (pages 70 - 71)

- | | |
|------------------|------------|
| 1. A | 6. C |
| 2. B | 7. C, D, E |
| 3. A, B, C, E | 8. B, C, E |
| 4. A, C, E | 9. D |
| 5. A, B, C, D, E | 10. B |

clauses non déterminantes de l'engagement de l'une ou l'autre des parties, le caractère rétroactif de l'annulation et la possibilité d'obtenir une indemnisation indépendamment de l'annulation.

Mais elles apportent deux règles inédites :

- l'annulation n'est plus l'œuvre exclusive du juge : elle peut être constatée d'un commun accord par les parties ;
- le risque d'annulation du contrat peut être levé à l'initiative d'une partie qui peut demander par écrit à l'autre de confirmer le contrat ou d'agir en nullité dans un délai de six mois à peine de forclusion. Cette action interrogatoire pourra être exercée pour les contrats en cours au 1^{er} octobre 2016.

Caducité du contrat

Construction essentiellement prétorienne, la caducité est introduite dans le Code civil en tant que mode d'extinction du contrat.

Elle intervient si l'un des éléments essentiels du contrat disparaît. Par ailleurs, lorsque l'exécution de plusieurs contrats est nécessaire à la réalisation d'une même opération et que l'un d'eux disparaît, sont caducs les contrats dont l'exécution est rendue impossible par cette disparition et ceux pour lesquels l'exécution du contrat disparu était une condition déterminante du consentement d'une partie ; mais la caducité n'intervient que si le contractant contre lequel elle est invoquée connaissait l'existence de l'opération d'ensemble lorsqu'il a donné son consentement.

Cette disposition reprend pour partie les principes jurisprudentiels régissant les contrats indivisibles ou interdépendants. L'indivisibilité peut être objective (un contrat ne peut pas être exécuté sans l'autre) ou subjective (tous les contrats ont déterminé le consentement d'une partie). Elle tranche le sort du contrat lié à celui qui disparaît : il est caduc, et non résolu comme certaines décisions antérieures l'avaient retenu.

3. Restitutions

La réforme institue un régime général des restitutions qui s'applique en cas d'annulation, de caducité et de résolution du contrat, ainsi qu'à la répétition de l'indu.

Effets et exécution du contrat

Une section est consacrée à la durée du contrat et a le mérite de reprendre de manière claire les principes selon lesquels le contrat à durée indéterminée peut être rompu à tout moment par chacune des parties et le contrat à durée déterminée exécuté jusqu'à son terme.

Est intégrée dans le Code civil la règle selon laquelle si les tiers contribuent à la violation d'un contrat, leur responsabilité délictuelle peut être engagée.

Conformément à la jurisprudence de la Cour de cassation, l'exécution forcée en nature devient le principe alors que le Code civil actuel ne la prévoyait qu'en cas d'obligation de donner. L'exception réside dans le cas où le coût pour le débiteur serait disproportionné avec l'intérêt du créancier.

L'exception d'inexécution est généralisée à tous les contrats dès lors que l'inexécution est suffisamment grave.



La modification majeure au stade de l'exécution du contrat est l'admission, en droit français, de la théorie de l'imprévision. Refusée depuis 1876, l'intervention du juge est désormais admise. Ainsi, si en cas de changement de circonstances, imprévisibles lors de la conclusion du contrat, l'exécution du contrat devient excessivement onéreuse pour l'un des contractants, les parties devront renégocier le contrat. En cas de refus ou d'échec, le juge sera compétent pour résilier ou réviser le contrat.

Néanmoins, selon certains auteurs, la révolution de cette réforme réside dans l'insertion des contrats d'adhésion dans le Code civil et la possible suppression judiciaire des clauses abusives. Pour la première fois depuis 1804, le contrat n'est plus uniquement perçu comme un accord de volonté, ce qui reflète la réalité des relations contractuelles. Le contrat d'adhésion est défini comme celui dont les conditions générales n'ont pas été négociées et ont été déterminées à l'avance par l'un des contractants.

Alors que seuls le Code de la consommation et le Code de commerce permettaient la suppression des clauses abusives, cette possibilité est ouverte dans le droit commun des contrats dès lors que les clauses créent un déséquilibre contractuel significatif. Ces clauses seront alors réputées non-écrites. Par ailleurs, en termes d'interprétation du contrat, la règle selon laquelle le contrat d'adhésion s'interprète contre celui qui l'a proposé est consacrée.

Le nouveau concept « d'action interrogatoire » est introduit et connaît trois applications. Elle permet :

- à un tiers de demander au bénéficiaire d'un pacte de préférence s'il souhaite s'en prévaloir et à défaut de réponse dans un délai raisonnable, le bénéficiaire ne pourra plus agir ;
- à un contractant de « forcer » l'autre partie à opter pour l'annulation ou la confirmation du contrat en cas de nullité relative ;
- à un tiers de purger les doutes qui peuvent exister sur l'étendue des pouvoirs du représentant habilité à conclure un acte, en lui demandant confirmation de son habilitation par écrit.

Ce mécanisme a le mérite d'instaurer une meilleure sécurité juridique.

Enfin, en matière de remèdes à l'inexécution, l'ordonnance prévoit la faculté de réduire unilatéralement le prix par mise en demeure, mais également de recourir à la faculté de remplacement sans autorisation du juge.

En conclusion, cette réforme ne doit pas effrayer dans la mesure où l'essentiel des dispositions n'est qu'une codification de jurisprudences bien établies. ■■

*Ord. 2016-131 du 10 février 2016 ; JO du 11 février texte n° 26

CONSOMMATION

Cliquer est jouer

Internet facilite tellement les démarches qu'on est souvent tenté de « zapper » les conditions générales de vente par cause de manque de temps ou pensant qu'elles sont certainement semblables à toutes les clauses que l'on rencontre habituellement.

C'est évidemment une erreur qui peut entraîner loin, et il vaut mieux au moins lire l'essentiel que de ne rien faire.

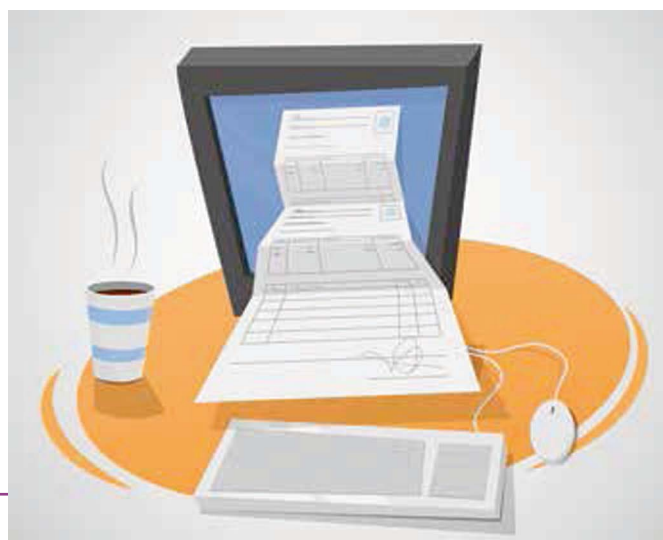
En voici une illustration concernant une clause attributive de compétence, sachant que cette jurisprudence s'appliquera certainement à d'autres types de clause.

Les parties à un contrat, dont l'une au moins a son domicile sur le territoire d'un État membre de l'Union européenne, peuvent convenir d'un tribunal d'un État membre pour connaître des différends nés ou à naître à l'occasion de leur relation. Cette convention attributive de juridiction doit être conclue, notamment, par écrit ou verbalement avec confirmation écrite ; toute transmission par voie électronique qui permet de consigner durablement la convention est considérée comme revêtant une forme écrite, selon la réglementation européenne. Ces conditions de forme tendent à s'assurer que la partie à laquelle la clause est opposée y a effectivement consenti (CJCE 24-6-1981 aff. 150/80).

Considérant cette réglementation, la CJUE a jugé récemment* que la technique d'acceptation par « clic » des conditions générales d'un contrat de vente conclu par voie électronique, qui contiennent une convention attributive de juridiction, constitue une transmission par voie électronique permettant de consigner durablement cette convention, au sens de cette disposition, lorsque cette technique rend possibles l'impression et la sauvegarde du texte de celles-ci avant la conclusion du contrat.

Ainsi, cocher la case d'acceptation des conditions générales de vente figurant sur un site internet vaut acceptation d'une clause attributive de compétence dès lors que cette technique rend possibles la sauvegarde et l'impression du texte avant de conclure. ■■

*CJUE 21 mai 2015 aff. 322/14, E c/ CarsOnTheWeb. Deutschland GmbH



© FranMarin/Fotolia.com

PUBLICATION

Vente ou apport de fonds de commerce

La loi visant à renforcer la liberté, l'indépendance et le pluralisme des médias rétablit l'obligation de publier, sous forme d'extrait ou d'avis, l'acte de vente ou d'apport de fonds de commerce dans un journal habilité à recevoir les annonces judiciaires et légales dans l'arrondissement ou le département dans lequel le fonds est exploité. Cette obligation, qui avait été supprimée par la loi 2015-990 pour la croissance et l'activité du 6 août 2015, dite loi Macron, s'applique à nouveau aux opérations intervenues depuis le 16 novembre 2016*.

La publication doit intervenir à la diligence de l'acquéreur ou de la société bénéficiaire de l'apport dans les quinze jours de la vente ou de l'apport du fonds de commerce.

Dans ce même délai, l'acquéreur ou la société doit également faire publier la vente ou l'apport au Bulletin officiel des annonces civiles et commerciales qui est consultable gratuitement par voie électronique.

Avant la loi Macron du 6 août 2015, si des mentions requises dans l'insertion relative à l'apport du fonds de commerce figuraient dans l'insertion relative à la constitution de la société, et si les deux insertions étaient publiées dans le même numéro du journal d'annonces légales, il pouvait être procédé à une simple référence à cette dernière insertion. La loi de 2016 n'a pas rétabli cette faculté.

L'article 21 de la loi modifie également les dispositions du code général des impôts qui fixent le point de départ du délai de quarante-cinq jours imparti pour déposer la déclaration administrative de cession ou de cessation d'activité. Il est ainsi prévu que dans le cas de cession d'un fonds de commerce, par vente ou apport, ce délai commence à courir du jour où la cession a été publiée dans un journal habilité à recevoir les annonces judiciaires ou légales. L'inscription au Bodacc constituait jusqu'à présent le point de départ du délai de quarante-cinq jours. ■■

*Loi 2016-1524 du 14-11-2016 art. 21 : JO du 15-11

TEXTES JURIDIQUES

Ministère des Affaires sociales et de la Santé
(JO du 13/11/2016)

Arrêté du 7 novembre 2016 portant approbation de l'avenant n° 5 à la convention nationale organisant les rapports entre les directeurs de laboratoires privés d'analyse médicale et l'assurance maladie

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033369807&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 4/11/2016)

Décret n° 2016-1479 du 2 novembre 2016 relatif aux modalités de mise en œuvre de l'expérimentation de mise en place systématique d'une consultation et d'un suivi spécialisés destinés à toute femme enceinte consommant régulièrement des produits du tabac

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00003338541&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 8/11/2016)

Arrêté du 3 novembre 2016 modifiant la liste des spécialités pharmaceutiques prises en charge en sus des prestations d'hospitalisation mentionnée à l'article L. 162-22-7 du code de la sécurité sociale

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033356912&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Familles, de l'Enfance
et des Droits des femmes (JO du 9/11/2016)

Décret n° 2016-1503 du 7 novembre 2016 relatif au médecin référent « protection de l'enfance » pris en application de l'article L. 221-2 du code de l'action sociale et des familles

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033359294&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 10/11/2016)

Décret n° 2016-1505 du 8 novembre 2016 relatif aux établissements de santé assurant le service public hospitalier

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033361470&dateTexte=&categorieLien=id>

Décret n° 2016-1506 du 8 novembre 2016 portant simplification des procédures administratives relevant de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail dans le domaine des médicaments vétérinaires

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033361526&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 15/11/2016)

Arrêté du 4 novembre 2016 relatif à la valorisation des activités médicales programmées réalisées en première partie de soirée

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033385735&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 4 novembre 2016 modifiant l'arrêté du 30 avril 2003 relatif à l'organisation et à l'indemnisation de la continuité des soins et de la permanence pharmaceutique dans les établissements publics de santé et dans les établissements publics d'hébergement pour personnes âgées dépendantes

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033385749&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 4 novembre 2016 modifiant l'arrêté du 22 février 1990 fixant la liste des substances classées comme psychotropes

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033385763&dateTexte=&categorieLien=id>

Avis relatif au concours pour le recrutement des praticiens-conseils chargés du service du contrôle médical du régime général de la sécurité sociale, du régime social des indépendants et exerçant au sein des agences régionales de santé

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033386463&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 17/11/2016)

Décret n° 2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif aux médicaments de thérapie innovante

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033394050&dateTexte=&categorieLien=id>

Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 relatif aux recherches impliquant la personne humaine

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033394083&dateTexte=&categorieLien=id>

Décret n° 2016-1538 du 16 novembre 2016 relatif à la convention unique pour la mise en œuvre des recherches à finalité commerciale impliquant la personne humaine dans les établissements de santé, les maisons et les centres de santé

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033394438&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 16 novembre 2016 fixant le modèle de convention unique prévu à l'article R1121-4 du code de la santé publique [concerne directement la recherche impliquant la personne humaine]

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033394466&dateTexte=&categorieLien=id>

Ministère des Affaires sociales et de la Santé (JO du 18/11/2016)

Décret n° 2016-1545 du 16 novembre 2016 autorisant la création d'un traitement de données à caractère personnel dénommé « dossier médical partagé »

Texte accessible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000033415677&dateTexte=&categorieLien=id>

ÉCHOS PARLEMENTAIRES

Professionnels de santé libéraux oubliés dans la Loi Santé ?

C'est la question du sénateur Alain Houpert au ministère de la Santé en avril 2015 : la place des infirmiers libéraux dans ce qui était encore le projet de loi de modernisation du système de santé. Depuis de nombreuses années, les infirmiers libéraux réclament la création d'une consultation infirmière dans le cadre de leurs compétences propres, qui, en plus de dégager du temps utile pour les médecins, permettrait d'avoir auprès des patients les acteurs de santé les plus qualifiés. Les infirmiers libéraux appréhendent aujourd'hui le projet de transfert de certains de leurs actes réglementés à du personnel non qualifié, au mépris de la qualité des soins, et, à brève échéance, ils craignent la fin du libre choix du praticien par le patient et la *mise à mort* du système des soins ambulatoires. Écartés des concertations, ils se sentent méprisés et s'interrogent sur leur place et leur fonction. Le ministère entend-il donner une suite favorable à leurs attentes, afin que ces professionnels se sentent à nouveau écoutés et réintégrés dans le programme du gouvernement car cette loi *conçue pour les patients semble l'être contre les professionnels*, contrairement à ce qu'avait affirmé la ministre : « *Ce projet de loi sera un acte de confiance envers les professionnels libéraux* » !

Réponse (réfléchie) du Ministère des Affaires sociales et de la Santé... le 6 octobre 2016 : la loi n° 2016-41 du 26 janvier 2016 de modernisation de notre système de santé prévoit en son article 119 un exercice en *pratique avancée* des auxiliaires médicaux relevant des titres I à VII du livre III du Code de la santé publique. Ces professionnels seront amenés à exercer au sein d'équipes coordonnées par un médecin, à réaliser des activités d'orientation, d'éducation, de prévention ou de dépistage ; à procéder à des actes d'évaluation, de conclusion clinique, techniques et de surveillance clinique et paraclinique ; à effectuer des prescriptions de produits de santé non soumis à prescription médicale obligatoire, des prescriptions d'examens complémentaires et à renouveler ou adapter des prescriptions médicales, dans des conditions définies par décret.

Les infirmiers seront les premiers auxiliaires médicaux pour lesquels cet exercice sera construit. S'agissant des actes infirmiers, la loi ne prévoit pas à ce jour, de transfert de ces actes à des personnes non qualifiées. ■■

J.-M. M.



© eve/fotolia.com



© David Pereira/fotolia.com

Proposition de loi : GPA et reconnaissance de l'enfant

Cette proposition de loi a été déposée au Sénat par 13 parlementaires à l'initiative de Jacques Mézard pour autoriser la transcription à l'état-civil français des actes de naissance des enfants nés à l'étranger par gestation pour autrui (GPA).

La législation française interdisant la GPA, nombre de couples partent vers les pays qui l'autorisent mais la France refuse de transcrire sur les livrets de famille les actes d'état-civil au motif que la demande est *contraire à l'ordre public international français*.

Quel est le statut juridique de ces enfants nés à l'étranger d'une GPA illégale mais dont les parents veulent faire reconnaître en France la filiation à partir l'état-civil dressé sur place ?

Le droit français considère que la maternité est certaine par le fait de l'accouchement (*mater semper certa est*). Aussi, en l'absence de transcription, la vie de ces familles devient compliquée, ce qui place les enfants dans une situation très fragile et les prive d'un certain nombre de prérogatives : en cas de divorce des parents ou de décès de la mère, par exemple. Et s'ils sont nés par GPA dans un pays étranger qui ne reconnaît pas le droit du sol, ces enfants sont apatrides !

Cette situation n'est pas tolérable. Il n'est pas possible que ces enfants qui, selon la législation de leur pays d'origine, n'ont pas d'autres parents que ceux qui ont contracté un contrat de GPA soient pénalisés du seul fait de leur mode de conception.

À plusieurs reprises, la Cour européenne des droits de l'homme (CEDH) a condamné la France pour avoir refusé de transcrire à l'état-civil des actes de naissance d'enfants nés à l'étranger par GPA : la CEDH estime que l'article 8 de la Convention de sauvegarde des Droits de l'Homme et des Libertés fondamentales protège le droit au respect de la vie privée, ce qui implique que « *chacun puisse établir les détails de son identité d'être humain, ce qui inclut sa filiation* ».

C'est pourquoi cette proposition de loi vise à autoriser la transcription à l'état-civil français des actes de naissance des enfants nés à l'étranger par GPA.

La proposition de loi comporte un article unique : après l'article 336-1 du Code civil, il est inséré un article 336-2 ainsi rédigé : « Art. 336-2. - Lorsque l'état civil de l'enfant a été établi par une autorité étrangère en conformité avec une décision de justice faisant suite à un protocole de gestation pour autrui, cet état-civil est transcrit dans les registres français sans contestation possible, aux conditions que la décision de justice soit conforme aux lois locales applicables, que le consentement libre et éclairé de la femme qui a porté l'enfant soit reconnu par cette décision et que les voies de recours contre cette décision soient épuisées. » ■■

J.-M. M.

Fracture sanitaire ? Les réponses du ministère

Gilbert Bouchet et François Commeinhes, sénateurs, évoquent pour le ministère de la Santé une enquête de l'UFC-Que choisir de juin 2016 sur la *fracture sanitaire* [différence d'accès aux soins selon les régions-NDLR], qui a analysé l'accès aux soins dans ses dimensions géographique et financière. Il en résulte une aggravation des *déserts médicaux* : généralistes et spécialistes (pédiatres). Si 4 % de la population vivent dans un désert médical pour l'accès aux généralistes, c'est près de 10 % pour l'accès aux pédiatres et gynécologues. Question : quelles propositions le Gouvernement entend présenter pour améliorer l'accès aux soins

Justification du ministère : depuis 2012, le gouvernement s'est engagé à améliorer l'accès aux soins de proximité, réduire les inégalités entre territoires et lutter contre les déserts médicaux, selon le *Pacte territoire santé* en 12 engagements qui, 3 ans après son lancement, affiche des résultats.

L'un de ses axes concerne l'exercice coordonné. Les maisons et les centres de santé renforcent l'attractivité des territoires pour les professionnels de santé et améliorent la qualité des soins et du suivi médical, une prise en charge des patients dans un lieu central. Ces projets répondent aux attentes des professionnels de santé : 174 maisons de santé pluri-professionnelles (MSP) en 2012, plus de 800 aujourd'hui. Objectif : fin 2017, 1 200 MSP réparties sur le territoire, notamment dans les zones fragiles, et 1 400 en 2018.

Pour encourager l'installation en zones sous-dotées le Contrat d'engagement de service public (CESP) s'adresse aux jeunes en formation, il leur assure une bourse en contrepartie d'une installation en *zone fragile* : 1 750 jeunes se sont engagés dans le dispositif depuis sa création, près de 450 contrats nouveaux ont été signés pour 2014-2015, 2 100 en 2017 et 2 550 en 2018 devraient l'être.

De plus le contrat de praticiens territoriaux de médecine générale (PTMG) sécurise l'installation des jeunes médecins lors des 2 premières années d'installation. Il a permis l'installation de près de 600 professionnels dans des territoires manquant de médecins, il a été étendu en 2015 aux autres spécialités médicales avec la création de praticiens territoriaux de médecine ambulatoire (PTMA).

Enfin pour assurer partout l'accès aux urgences a été décidée la mise en place prioritaire de médecins correspondants du SAMU (MCS) : 150 en 2012 et désormais plus de 580. Les fonctions de MCS séduisent notamment les jeunes médecins grâce à des conditions d'exercice sécurisées, une for-

mation attractive en lien avec l'hôpital et le SAMU, un accompagnement juridique et financier. Les MCS interviennent là où le délai d'accès à l'urgence était supérieur à 30 minutes.

Le *Pacte territoire santé 2* (26/11/2015) comporte 2 axes : amplifier les actions menées depuis 2012 et innover encore dans la formation et les conditions d'exercice pour renforcer l'attractivité de la médecine libérale. Parmi les mesures figure l'augmentation du *numerus clausus* dans les régions en tension pour renforcer le relais entre les futurs médecins et les professionnels partant en retraite.

Par ailleurs, le nombre de spécialistes formés a été augmenté entre 2011 et 2015 (pédiatrie : + 17 %, gynécologie : + 22 %, ophtalmologie : + 42 %), un Comité interministériel aux ruralités a visé l'objectif de modulation régionale du *numerus clausus*, pour améliorer la répartition des médecins selon les besoins des territoires. Figurent également à ce Pacte 2 d'ici 2017 : 1 000 installations de généralistes et spécialistes avec un contrat de praticiens territoriaux de médecine générale ou ambulatoire ; 700 médecins correspondants des urgences en territoire isolé ; 1 000 maisons de santé.

Le Pacte 2 soutient en particulier le renforcement du *virage ambulatoire*, rééquilibrage entre les soins en ville et l'hôpital, une prise en charge renforcée des patients à domicile par les professionnels libéraux. La convention médicale signée cet été entre les syndicats de médecins libéraux et l'UNCAM oriente ses mesures vers l'égalité d'accès aux soins, et veut lutter contre les déserts médicaux grâce à une aide allant jusqu'à 50 000 euros pour le professionnel qui décide de s'installer. Et pour réduire la charge administrative et recentrer les professionnels sur les soins, les médecins seront accompagnés financièrement pour mise à jour des logiciels compatibles avec l'automatisation du tiers-payant.

Au final, dit le ministère, des mesures incitatives permettant progressivement d'apporter une réponse à la *problématique d'accès aux soins dans les territoires en tension*. ■■

Jean-Marie Manus

